

**INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEM
LEWIS LUNG TUMORWACHSTUM UND
MILZZELLSUBPOPULATIONEN**

MANFRED THIEL



Disbui. München
1988



Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Brendel

INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEM

LEWIS LUNG TUMORWACHSTUM UND

MILZZELLSUBPOPULATIONEN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Manfred Thiel

aus

Augsburg

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter : Prof.Dr.med.Dr.med.vet. C. Hammer
Prof.Dr. E. P. Rieber

Mitberichterstatter : Prof.Dr.med.Dr.h.c. W. Brendel
Prof.Dr.med. W. Wilmanns

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter : Dr.med. C. Lersch

Dekan : Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 7.04.88

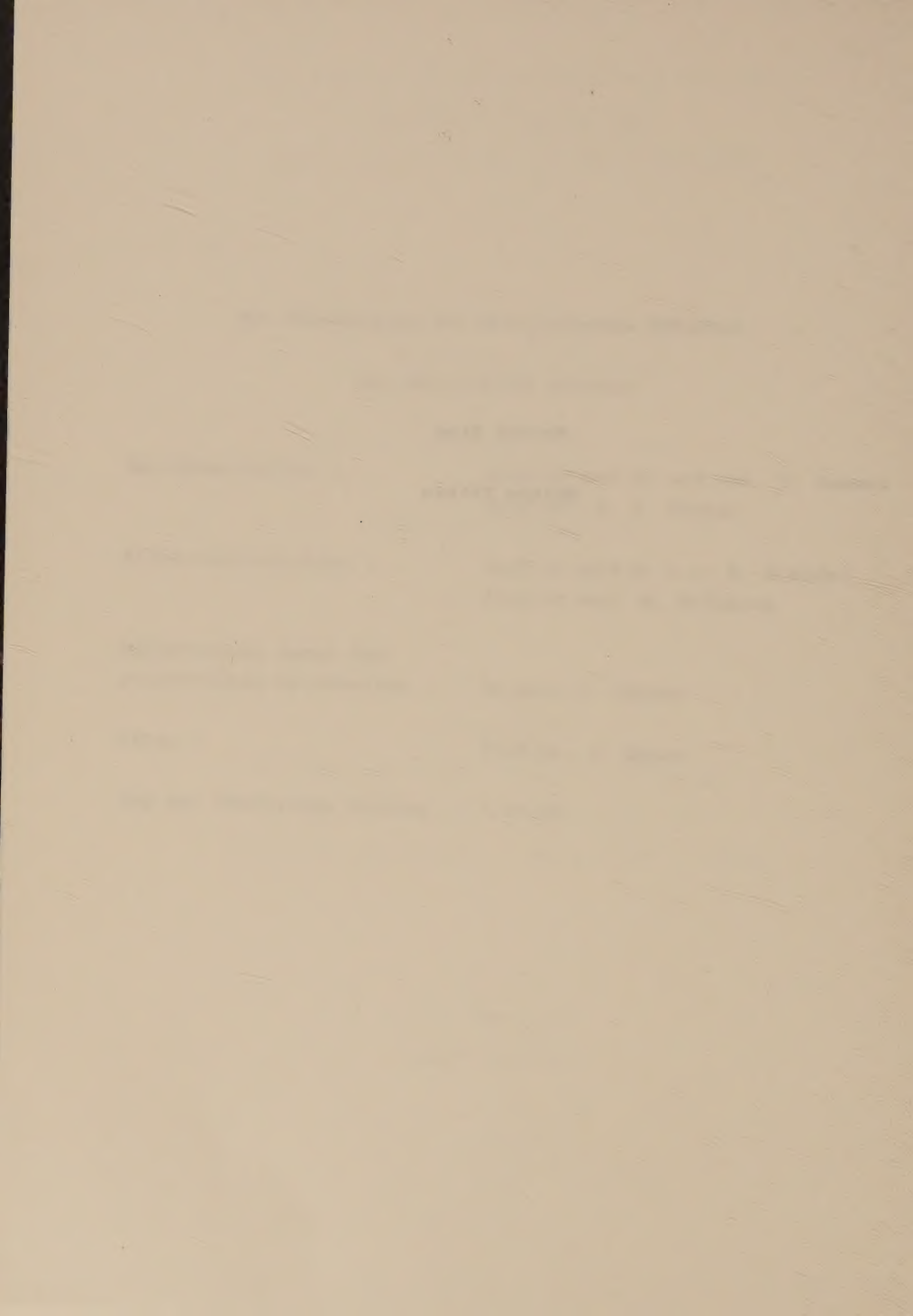
Meiner Frau

- 1.1.1. ...
- 1.1.2. ...
- 1.1.3. ...
- 1.1.4. ...
- 1.1.5. ...
- 1.1.6. ...
- 1.1.7. ...
- 1.1.8. ...
- 1.1.9. ...
- 1.1.10. ...
- 1.1.11. ...
- 1.1.12. ...
- 1.1.13. ...
- 1.1.14. ...
- 1.1.15. ...
- 1.1.16. ...
- 1.1.17. ...
- 1.1.18. ...
- 1.1.19. ...
- 1.1.20. ...
- 1.1.21. ...
- 1.1.22. ...
- 1.1.23. ...
- 1.1.24. ...
- 1.1.25. ...
- 1.1.26. ...
- 1.1.27. ...
- 1.1.28. ...
- 1.1.29. ...
- 1.1.30. ...
- 1.1.31. ...
- 1.1.32. ...
- 1.1.33. ...
- 1.1.34. ...
- 1.1.35. ...
- 1.1.36. ...
- 1.1.37. ...
- 1.1.38. ...
- 1.1.39. ...
- 1.1.40. ...
- 1.1.41. ...
- 1.1.42. ...
- 1.1.43. ...
- 1.1.44. ...
- 1.1.45. ...
- 1.1.46. ...
- 1.1.47. ...
- 1.1.48. ...
- 1.1.49. ...
- 1.1.50. ...
- 1.1.51. ...
- 1.1.52. ...
- 1.1.53. ...
- 1.1.54. ...
- 1.1.55. ...
- 1.1.56. ...
- 1.1.57. ...
- 1.1.58. ...
- 1.1.59. ...
- 1.1.60. ...
- 1.1.61. ...
- 1.1.62. ...
- 1.1.63. ...
- 1.1.64. ...
- 1.1.65. ...
- 1.1.66. ...
- 1.1.67. ...
- 1.1.68. ...
- 1.1.69. ...
- 1.1.70. ...
- 1.1.71. ...
- 1.1.72. ...
- 1.1.73. ...
- 1.1.74. ...
- 1.1.75. ...
- 1.1.76. ...
- 1.1.77. ...
- 1.1.78. ...
- 1.1.79. ...
- 1.1.80. ...
- 1.1.81. ...
- 1.1.82. ...
- 1.1.83. ...
- 1.1.84. ...
- 1.1.85. ...
- 1.1.86. ...
- 1.1.87. ...
- 1.1.88. ...
- 1.1.89. ...
- 1.1.90. ...
- 1.1.91. ...
- 1.1.92. ...
- 1.1.93. ...
- 1.1.94. ...
- 1.1.95. ...
- 1.1.96. ...
- 1.1.97. ...
- 1.1.98. ...
- 1.1.99. ...
- 1.1.100. ...

Meiner Frau

Meinen Eltern

- 2.1.1. ...
- 2.1.2. ...
- 2.1.3. ...
- 2.1.4. ...
- 2.1.5. ...
- 2.1.6. ...
- 2.1.7. ...
- 2.1.8. ...
- 2.1.9. ...
- 2.1.10. ...
- 2.1.11. ...
- 2.1.12. ...
- 2.1.13. ...
- 2.1.14. ...
- 2.1.15. ...
- 2.1.16. ...
- 2.1.17. ...
- 2.1.18. ...
- 2.1.19. ...
- 2.1.20. ...
- 2.1.21. ...
- 2.1.22. ...
- 2.1.23. ...
- 2.1.24. ...
- 2.1.25. ...
- 2.1.26. ...
- 2.1.27. ...
- 2.1.28. ...
- 2.1.29. ...
- 2.1.30. ...
- 2.1.31. ...
- 2.1.32. ...
- 2.1.33. ...
- 2.1.34. ...
- 2.1.35. ...
- 2.1.36. ...
- 2.1.37. ...
- 2.1.38. ...
- 2.1.39. ...
- 2.1.40. ...
- 2.1.41. ...
- 2.1.42. ...
- 2.1.43. ...
- 2.1.44. ...
- 2.1.45. ...
- 2.1.46. ...
- 2.1.47. ...
- 2.1.48. ...
- 2.1.49. ...
- 2.1.50. ...
- 2.1.51. ...
- 2.1.52. ...
- 2.1.53. ...
- 2.1.54. ...
- 2.1.55. ...
- 2.1.56. ...
- 2.1.57. ...
- 2.1.58. ...
- 2.1.59. ...
- 2.1.60. ...
- 2.1.61. ...
- 2.1.62. ...
- 2.1.63. ...
- 2.1.64. ...
- 2.1.65. ...
- 2.1.66. ...
- 2.1.67. ...
- 2.1.68. ...
- 2.1.69. ...
- 2.1.70. ...
- 2.1.71. ...
- 2.1.72. ...
- 2.1.73. ...
- 2.1.74. ...
- 2.1.75. ...
- 2.1.76. ...
- 2.1.77. ...
- 2.1.78. ...
- 2.1.79. ...
- 2.1.80. ...
- 2.1.81. ...
- 2.1.82. ...
- 2.1.83. ...
- 2.1.84. ...
- 2.1.85. ...
- 2.1.86. ...
- 2.1.87. ...
- 2.1.88. ...
- 2.1.89. ...
- 2.1.90. ...
- 2.1.91. ...
- 2.1.92. ...
- 2.1.93. ...
- 2.1.94. ...
- 2.1.95. ...
- 2.1.96. ...
- 2.1.97. ...
- 2.1.98. ...
- 2.1.99. ...
- 2.1.100. ...



INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Fragestellung</u>	2
2.1.	Erste Teilfrage	2
2.2.	Zweite Teilfrage	2
3.	<u>Material und Methode</u>	3
3.1.	Feinnadelaspirationszytologie aus subkutan verlagerten (s.c.v.) Milzen	3
3.1.1.	Versuchstiere	3
3.1.2.	Subkutane Verlagerung der Milz	3
3.1.3.	Tumor	4
3.1.4.	Entnahme von Milzgewebe	4
3.1.5.	Blutentnahme	5
3.1.6.	Vermessung der Milz	5
3.1.7.	Vermessung des Tumors	6
3.1.8.	Lichtmikroskopische Untersuchung der Milzzellen	7
3.1.9.	Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Milzzellen	8
3.1.10.	Bestimmung der absoluten Zellzahlen	12
3.1.11.	Bestimmung des Blutleukozytenanteils im Milzaspirat	13
3.1.12.1.	Messung der Chemilumineszenzaktivität (CA) der Milzzellen	14
3.1.12.2.	Einfluß von humoralen Faktoren auf die CA der Milzzellen	16
3.1.13.	Differentialblutbild und Leukozytenzählung . . .	17
3.1.14.	Messung des Tumorwachstums	18

3.1.15.	Überprüfung der Spezifität der Zellveränderungen in s.c.v. Milzen	21
3.1.15.1.	Zellveränderungen in intraabdominal gelegenen (i.a.g.) Milzen	21
3.1.15.2.	Zellveränderungen in s.c.v. Milzen durch Inokulation von Tumorzellhomogenaten	21
3.2.	Splenektomie und Scheinoperation von Mäusen mit verschiedenen Tumorstadien	24
3.2.1.	Splenektomie und Scheinoperation	24
3.3.	Statistik	25
4.	<u>Ergebnisse</u>	26
4.1.	Prozentuale Zellveränderungen in der Milz und im Blut vor und nach LL-Tumordinokulation . .	26
4.1.1.	Splenogramme s.c.v. Milzen	26
4.1.2.	Immunfluoreszenzmikroskopisch differenzierte Milzzellen	30
4.1.3.	Differentialblutbilder	33
4.2.	Absolute Zellveränderungen in der Milz und im Blut vor und nach LL-Tumordinokulation	35
4.2.1.	Beziehung zwischen der Masse s.c.v. Milzen und ihrem $b \times l$ Produkt (b: Breite und l: Länge der Milz)	35
4.2.2.	Masse, Zelldichte und absolute Zellzahlen s.c.v. Milzen	36
4.2.3.	Absolute Zahlen licht- und immunfluoreszenzmikroskopisch differenzierter Milzzellen	38
4.2.4.	Blutleukozytenzahlen	43
4.2.5.	Blutleukozytenzahl im Milzaspirat	44
4.3.	Tumorkinetik	45
4.3.1.	Zeitabhängigkeit der mittleren Quote $\bar{K}$ und $B \times L$ -Produkte der Lewis Lung Tumoren (B: Breite und L: Länge des Tumors)	45

4.3.2.	Beziehungen zwischen den Milzzellveränderungen und den Zeiten abnehmender Tumorstadiumsgeschwindigkeiten	47
4.3.3.	B x L - Produkte an den Tagen maximaler mittlerer Quoten $\bar{K}$ und durchschnittliche Tumorstadiumsgeschwindigkeiten	50
4.4.	Chemilumineszenzaktivität	50
4.4.1.	Einfluß humoraler Faktoren auf die CA	53
4.4.2.	Beziehungen zwischen der CA granulopoetischer Zellen der Milz und dem LL-Tumorstadium	53
4.5.	Ergebnisse zur Spezifität der Milzzellveränderungen in s.c.v. Milzen	55
4.5.1.	Auswirkungen der Subkutanverlagerung auf die normale Milz	55
4.5.2.	Veränderungen in s.c.v. und intraabdominal gelegenen (i.a.g.) Milzen nach LL-Tumorstadiuminokulation	56
4.5.3.	Zellveränderungen in s.c.v. Milzen durch Inokulation von Tumorstadiumzellhomogenaten	60
4.6.	Überlebenszeiten zu verschiedenen Tumorstadien splenektomierter und scheinoperierter Tiere	66
4.7.	Tabellenanhang: Zellveränderungen in der Milz und im Blut vor und nach LL-Tumorstadiuminokulation	70
4.7.1.	In Prozent	70
4.7.2.	Absolut	73
5.	<u>Diskussion</u>	76
5.1.	Versuchsergebnisse zur ersten Teilfrage	76
5.1.1.	Normale Prozent- und Absolutwerte licht- und immunfluoreszenzmikroskopisch differenzierter Milzzellen	76
5.1.2.	Absolute Veränderungen der Lymphozytenpopulationen in der Milz	80
5.1.3.	Ursache und Bedeutung der Splenomegalie beim (LL-) Tumorstadiumwachstum	85

5.1.4.	(LL-) Tumorwachstum assoziierte Granulozytose .	86
5.1.5.	CA-Veränderungen granulopoetischer Milzzellen .	93
5.1.6.	Hemmen Granulozyten das Wachstum von LL-Tumoren?	98
5.2.	Methodik	101
5.2.1.	Messung des Tumorwachstums	101
5.2.2.	Feinnadelaspirationsbiopsie	102
5.2.3.	Messung der Chemilumineszenz	105
5.3.	Versuchsergebnisse zur zweiten Teilfrage	108
5.3.1.	Auswirkungen der Splenektomie auf das (LL-)Tumorwachstum	108
5.3.2.	Wie schützt die Milz das (LL-)Tumorwachstum? . .	112
5.3.3.	Herkunft der beim LL-Tumorwachstum gebildeten T-Suppressorzellpopulationen	118
5.3.4.	Ist das Enhancement der LL-Tumoren in der NRMI - Maus B - oder T-Zellen vermittelt? . . .	121
6.	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußfolgerungen</u>	124
7.	<u>Zusammenfassung</u>	128
8.	<u>Bisher veröffentlichte Teilaspekte vorliegender Arbeit</u>	130
9.	<u>Literaturverzeichnis</u>	132

Verwendete Abkürzungen und Symbole

Ak	Antikörper
b	Breite der Milz
B	Breite des Tumors
CA	Chemilumineszenzaktivität
CFU	Kolonien bildende Einheit
cpm	counts per minute
CSF	Kolonien stimulierender Faktor
E	Endwert
Fl	Fluktuation
G	Erdbeschleunigung
i.a.g.	intraabdominal gelegen
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
Ig G	Immunglobulin G
i.f.m.	immunfluoreszenzmikroskopisch
k	Wachstumsrate
k̇	momentane Wachstumsquote
k̄	mittlere Wachstumsquote (mWq)
l	Länge der Milz
L	Länge des Tumors
LL	Lewis Lung
Ly	Lymphozyten
MAB	Monoclonal Antibody
Max	Maximum
Min	Minimum
n	Tierzahl
n.s.	nicht signifikant
PCA	Peakchemilumineszenzaktivität
PMN	Polymorphkerniger Leukozyt
Pp	Proliferationspool
§	Zelldichte
Rp	Reifungspool
s.c.v.	subkutan verlagert
t	Zeit
V	Versuch
Z	Zelle
♀	weiblich
♂	männlich
↗	Anstieg
↘	Abfall



1. Einleitung

Der griechisch-römische Arzt Galen, dessen Schriften zusammen mit denen des Hippokrates bis weit ins Mittelalter hinein maßgebend für die Medizin waren, nannte die Milz ein "Organon plenum mysterii". Auch 1800 Jahre nach Galen spricht Bege-
mann (14) noch von der scheinbaren Funktionslosigkeit der Milz, das Rätselhafte dieses Organs andeutend. Dennoch haben sich in den vergangenen Jahrzehnten die Erkenntnisse über die Milz erheblich gemehrt. Erwähnenswert sind die Arbeiten von Brüda (23), in denen er zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Beeinflussung des Tumorwachstums durch die Milz beschreibt. Seither sprachen sich, ähnlich wie Brüda, weitere Autoren für einen blastomhemmenden Effekt der Milz aus (68, 77). Andererseits wurden auch Stimmen laut, die der Milz einen tumorschützenden Einfluß zuschrieben (31, 34, 57, 126, 130). Bis heute herrscht also Unklarheit darüber, welche Rolle die Milz beim Wachstum von Tumoren spielt.

Die hier bearbeitete Frage nach dem Einfluß der Milz auf das Tumorwachstum ist daher keine neue. Sie hat jedoch nicht an Aktualität verloren, nachdem in letzter Zeit neben den gegenwärtig am häufigsten praktizierten Methoden der Krebsbehandlung mit "Stahl und Strahl" und chemischer Zytostase auch der Immuntherapie vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt wird. Bedenkt man, daß die menschliche Milz eines jungen, gesunden Erwachsenen ca. 15 % aller Lymphozyten des Körpers oder das Siebenfache der Lymphozyten des gesamten Blutes enthält, und durch sie wahrscheinlich 10 bis 20 mal mehr Lymphozyten als durch alle Lymphknoten pro Tag zirkulieren (127), so begreift man schnell die immunologische Bedeutung dieses Organs. Wie diese Zahlen und die nicht selten beschriebenen Postsplenektomiesyndrome (106) vermuten lassen, wird eine Splenektomie für die immunologische Situation des an einem Tumor erkrankten Organismus Folgen haben. Ob sie zu seinem Nachteil oder

zu seinen Gunsten ausfallen, hängt vom funktionellen Verhalten der Milz zum Zeitpunkt ihrer Entfernung ab. Die sich hieraus ergebende Möglichkeit, die Splenektomie immuntherapeutisch bei Tumorerkrankungen einzusetzen, stellt für uns den wichtigsten klinischen Bezug unserer Fragestellung dar.

2. Fragestellung

Welche Interaktionen bestehen zwischen der Milz und dem Tumorwachstum?

Die Betonung liegt hierbei auf "Interaktion", d. h. einer möglichen Beeinflussung der Milz durch das Tumorwachstum und umgekehrt. Somit gliedert sich unsere Fragestellung bei der Betrachtung aus der Blickrichtung der Milz und des Tumors in die zwei nachfolgenden, präziser formulierten Teilfragen.

2.1. Erste Teilfrage

Welche Veränderungen ruft das Tumorwachstum in der Milz hervor?

2.2. Zweite Teilfrage

Wie wirken sich diese tumorinduzierten Milzveränderungen umgekehrt auf das Tumorwachstum aus?

3. Material und Methode

3.1. Feinnadelaspirationszytologie aus subkutan verlagerten (s.c.v.) Milzen

3.1.1. Versuchstiere

Ausgezüchtete weibliche und männliche NRMI-Mäuse waren bei Versuchsbeginn 8 - 12 Wochen alt. Sie wurden in einem Raum mit einer Beleuchtungsautomatik (Tag-, Nachtrhythmus) bei 22° C und 65 % Luftfeuchtigkeit in Plastikkkäfigen gehalten. Wasser und Pellets erhielten sie nach Belieben.

3.1.2. Subkutane Verlagerung der Milz

Modifiziert nach einer von Weiss und Hess (189) beschriebenen Methode wurden die Tiere unter Äthernarkose an der linken Seite subcostal laparotomiert, die Milz mobilisiert, durch die abdominelle Muskellücke hervorgezogen und unter die Haut verlagert. Das Organ wurde nicht weiter fixiert. Lediglich die Muskellücke wurde mit einer Tabaksbeutelnaht ¹⁾ soweit eingengt, daß die Milz nicht mehr in die Abdominalhöhle zurückgleiten konnte. Durch Injektion von 5 % isotoner Trypanblaulösung in die Milz konnte die Unversehrtheit des durch die verbliebene Muskellücke ziehenden Gefäßstieles überprüft werden. Bei ungestörtem venösem Abfluß verfärbten sich die Milzvenen nach Farbstoffinjektion blau. Anschließend wurde die die Milz aufnehmende Hauttasche mit drei Einzelknopfnähten ¹⁾ verschlossen. Nach der Subkutanverlagerung verstrichen 20 bis 26 Tage bis zur ersten Feinnadelpunktion der Milzen.

1) : Prolene 3.0, Ethicon GmbH, 2000 Norderstedt

3.1.3. Tumor

Das in allen Versuchen verwendete Lewis Lung Carcinom wurde 1938 von Lewis durch 1,2,5,6-Dibenzanthrazen in C 57 BL/6 Mäusen induziert (173) und seit 10 Jahren durch fortwährende subkutane Tierpassagen auf NMRI-Mäusen adaptiert. Für die Herstellung von Tumorzellsuspensionen wurden die Spendertiere mit Äther getötet und das vitale Tumorgewebe nach Hautdesinfektion mit Kodanlösung entfernt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Tumorgewebe wurde grobmechanisch durch Zerreiben an Stahlnetzen in physiologischer Kochsalzlösung ¹⁾ zerkleinert. Nach der Passage einer dickeren und dann einer dünneren Stahlkanüle ²⁾ wurde in der Tumorzellsuspension die Zellkonzentration mit einem automatischem Zählgerät ³⁾ bestimmt. Die Tumorzellsuspension wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Endkonzentration von 1×10^8 Zellen pro 1 ml eingestellt. Die pro Versuchstier inokulierten Tumorzellzahlen betrugen in Versuch 1, 2, 3 und 4 55×10^6 , 29×10^6 , 37×10^6 und 53×10^6 Zellen. Im Splenektomieversuch wurden 50×10^6 Tumorzellen inokuliert.

3.1.4. Entnahme von Milzgewebe

Milzgewebe wurde nach Punktion der s.c.v. Organe mit Spinalkanülen aspiriert. Dazu wurde eine 2 ml Plastikspritze und die darauf fest aufgesetzte Spinalkanüle ⁴⁾ mit heparinhaltiger (50 I.E. Heparin ⁵⁾/ml) Hanks Bufféred Salt Solution ⁶⁾

1) : Klinikapotheke

2) : Sterican Lok 16 6, 206 B. Braun Melsungen

3) : Clay Adams Hematology Analyzer S, Becton Dickinson New Jersey 07054 USA

4) : Spinal Needle B-D, 9/-7, 226,3 1/2 B. Braun Melsungen

5) : Heparin Natrium, B. Braun Melsungen

6) : Tris-Hank'sche Lösung, pH 7,4, ohne Phenolrot, Klinikapotheke

(HBSS) einmal gespült. Anschließend wurde die Spritze mit 0,5 ml heparinhaltiger HBSS-Lösung gefüllt. Die von der Nadelspitze bis zum Spritzenkolben reichende von Luftblasen freie Flüssigkeitssäule gewährleistete eine optimale Saugwirkung. Nach Desinfektion der Einstichstelle mit Kodanlösung wurde unter Äthernarkose die Milzpunktion vorgenommen. Das über der Milz gelegene Fell des Tieres wurde in Stichrichtung angespannt, die Milz zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand festgehalten. Mit der rechten Hand wurde die auf der Spritze aufgesetzte Nadel tangential zur Milzoberfläche eingestochen. Dadurch konnten Verletzungen der Milzgefäße im Hilusbereich verhindert werden. Nachdem die Nadelspitze in das Milzparenchym eingedrungen war, wurde sie unter Ausübung von Sog wenige Millimeter in Richtung des Stichkanals hin und her bewegt. Die beim Herausziehen der Nadel einströmende Luft riß die in der Nadel befindlichen Zellen mit in die Spritze. Nach Ansaugen weiterer Spülflüssigkeit aus einem Plastikröhrchen, das 2,5 ml heparinisierte HBSS-Lösung enthielt, wurde der Spritzeninhalt in dieses entleert. Durch erneutes Aufziehen und Ausspritzen der Zellsuspension erreichte man ohne größere mechanische Zellschädigung eine gute Suspendierung der ausgestanzten Milzgewebeprobe.

3.1.5. Blutentnahme

Die Entnahme von ca. 40 μ l Blut erfolgte aus der ventralen Schwanzvene. Zur Verbesserung der peripheren Blutzirkulation wurden die Tiere vorher mit Rotlicht erwärmt.

3.1.6. Vermessung der Milz

Nach der subkutanen Verlagerung liegt die Milz U-förmig in ihrer Hauttasche. Die untenstehende Zeichnung soll die von oben gesehen einem flachen Zylinder gleichende Milzform

verdeutlichen. mit Hilfe einer Schublehre wurde die Breite b und die Länge l der Milz gemessen. Abgelesen wurde die Einstellung an der Schublehre, bei der die beiden Backen der Schublehre gerade mit beginnendem Widerstand über die Milz geführt wurden. Aus beiden Größen bildeten wir das Produkt $b \times l$, als ein zur Milzmasse proportionales Maß.

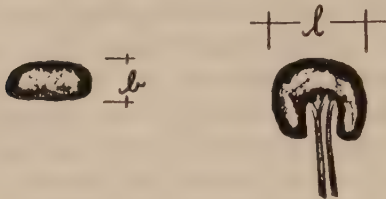


Abb. 1: Vermessung der Milz

3.1.7. Vermessung des Tumors

Die Tumorgröße wurde durch das Produkt der zwei größten zueinander senkrecht stehenden Tumordurchmesser ($B \times L$) bestimmt, (66).

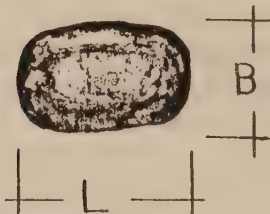


Abb. 2: Vermessung des Tumors

3.1.8. Lichtmikroskopische Untersuchung der Milzzellen

Durch Feinnadelpunktion gewonnenes Milzgewebe wurde in der unter 3.1.4. beschriebenen Weise dispergiert. Für die Anfertigung eines Zytozentrifugenpräparates wurden von der Suspension 100 μ l entnommen und mit weiteren 50 μ l HBSS-Lösung verdünnt (s. Abb. 3). Die Probe wurde in die Küvette einer Zytozentrifuge ¹⁾ gegeben. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 500 U/min - entsprechend 30 G - waren die Zellen auf eine kreisförmige Fläche von 0,2 cm^2 des Objektträgers aufgetragen. Bei Einsatz von durchschnittlich 100000 Zellen pro Küvette wurden Präparate mit optimaler Zelldichte erhalten (49). Nach Lufttrocknen wurden die Zytozentrifugenpräparate nach Pappenheim (13, 181) gefärbt und unter einem Universallichtmikroskop ²⁾ differenziert. Folgende Zellreihen im Milzaspirat wurden unterschieden:

- | | | |
|----------------------------|---|---|
| Lymphatische Zellreihe | : | Die verschiedenen Zellformen der Lymphopoese wurden als "Lymphozyten" zusammengefaßt. |
| Myeloische Zellreihe | : | Die verschiedenen Zellformen der Granulopoese wurden dem Proliferationspool: Myeloblast
Promyelozyt
Myelozyt

und dem Reifungspool: Juveniler
Stabkerniger
Segmentkerniger
(PMN)

zugeordnet.
Die vom Myeloblasten bis zum stabkernigen reichenden Zellarten wurden als unreife granulopoetische Zellformen zusammengefaßt. |
| Erythropoetische Zellreihe | : | Die verschiedenen Zellformen dieser Reihe wurden als "erythropoetische Zellen" zusammengefaßt. |

1) : Zytozentrifuge, Cytospin II, Shandon, Labortechnik GmbH, Frankfurt

2) : Zeiss-Mikroskop, Standard, Oberkochen

3.1.9. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Milzzellen

Man unterscheidet zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenz (191). Bei der direkten Fluoreszenz bindet ein Antikörper, der selbst mit einem Fluorochrom markiert ist, an ein Antigen. Bei der indirekten Fluoreszenz ist der das Antigen bindende Antikörper unmarkiert. An diesen ersten Antikörper koppelt man einen zweiten fluoreszierenden Antikörper. Das Antigen wird somit "indirekt" sichtbar gemacht. Für die direkte Immunfluoreszenz wurden folgende Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) konjugierte Antiseren verwendet:

- a) Anti-Maus-Y-Globulin-Serum¹⁾,
das an Zellen bindet, die auf ihren Oberflächen Immunglobuline der Y-Globulinfraction der Elektrophorese tragen. Dazu zählen IgG, IgM, IgA und IgD.
- b) Anti-Maus-IgG-Serum²⁾,
das spezifisch mit Zellen reagiert, die Immunglobulin G tragen.

Für die indirekte Immunfluoreszenz kamen folgende primären Antikörper zur Anwendung:

- c) Anti-Thy 1.2. -monoklonaler Antikörper³⁾,
der sich gegen ein Oberflächenantigen richtet, das auf Thymozyten und peripheren, thymusabhängigen T-Zellen der Maus vorkommt (134).
- d) Anti-Lyt 2.1 -monoklonaler Antikörper³⁾,
der sich gegen ein Oberflächenantigen richtet, das bevorzugt zytotoxische T-Zellen tragen (27, 157).

1) : Behring Institut, Marburg/Lahn

2) : Tago Inc. Burlingame, California

3) : Cederlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario, Canada

An die von Maushybridomen stammenden und der IgG-Klasse angehörenden monoklonalen Antikörper wurden vom Kaninchen stammende FITC-markierte Anti-Maus-IgG-Antikörper gekoppelt.

Nach Waschen der durch Feinnadelpunktion gewonnenen Milzzellen mit HBSS-Lösung in einer Laborzentrifuge "Rotanta/S"¹⁾ (5 min bei 1200 U/min, - was einer 240 fachen Erdbeschleunigung entspricht -), wurde das verbleibende Zellpellet in 100 μ l Portionen mit $1 - 6 \times 10^6$ Zellen aufgeteilt. Jeder Probe wurden 20 μ l eines mit Aqua dest 1:10 verdünnten Antiserums hinzugesetzt. Nach 45 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen und für die Immunfluoreszenz mit einem Zweitantikörper wieder für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Auf eine Lyse der Erythrozyten wurde verzichtet, um einen weiteren Leukozytenverlust zu vermeiden. Nach erneutem Waschen wurden jeweils 100 Milzzellen unter einem Immunfluoreszenzmikroskop²⁾ ausgezählt. Dazu wurde ein Tropfen jeder Probe auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt. Im Dunkelfeld des Ölinversionskondensors erkennt man bei Verwendung einer Halogenlampe und Zwischenschaltung von Filtern³⁾ leuchtend rote Zellen und eine grüngelbe Fluoreszenz vor einem schwarzen Hintergrund. Positiv gewertet wurden Zellen, die mindestens drei grünleuchtende Punkte trugen oder die ein besonders gut zu erkennendes "capping" zeigten. Als "capping" bezeichnet man die Wanderung von Oberflächen-Antigen-Antikörper-Komplexen zu einem Zellpool. Hierdurch zeigen markierte Zellen eine halbmondförmige Fluoreszenz (84). Die im direkten Immunfluoreszenztest erhaltenen Prozentwerte positiver Milzzellen bedürfen keiner Korrektur. Da beim

1) : Rotanta/S, Fa. Hettich, 7200 Tuttlingen

2) : Zeiss-Universal Fotomikroskop, Carl-Zeiss, 7/82 Oberkochen

3) : Halogenleuchte 12 V, 100 Watt

Zeiss Kondensor 1.2/1.4

Kp 500 Kurzpaßfilter; Bg 38 Rotfilter

indirekten Test der Zweitantikörper Anti-Maus-IgG-Antiserum auch mit den Immunglobulin G Molekülen auf den Milzzellen der Maus reagiert, erhält man den tatsächlichen Prozentsatz der Milzzellen, die für das Antigen des primären Antikörpers positiv sind, durch Differenzbildung zwischen dem im indirekten Test ausgezählten Prozentsatz und dem im direkten Test ermittelten Prozentsatz an Anti-Maus-IgG positiven Milzzellen. In Abb. 3 sind die Arbeitsschritte der licht- und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Milzzellen zusammengefaßt.

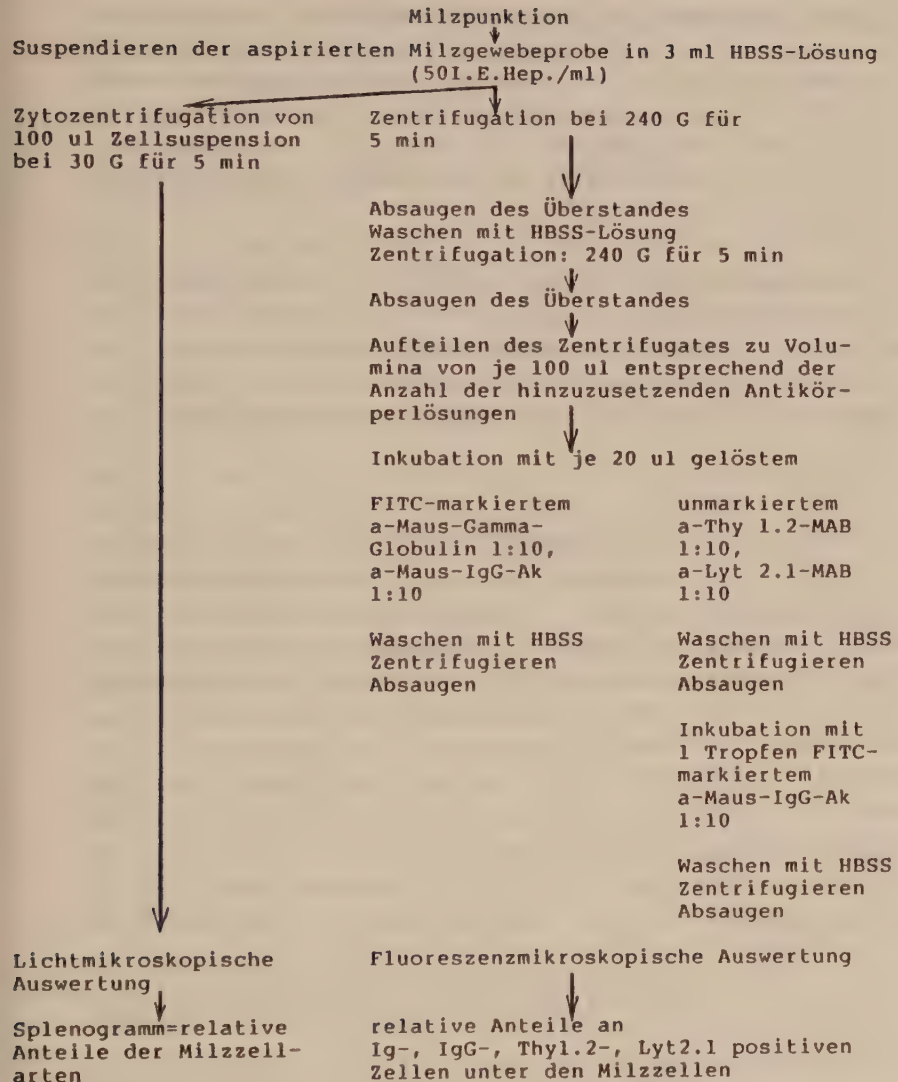


Abb. 3: Arbeitsschritte der licht- und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Zellen des Milzaspirats

3.1.10. Bestimmung der absoluten Zellzahlen

Zur Quantifizierung der Feinnadelaspirationsbiopsie wurde eine Eichkurve zwischen dem Produkt $b \times l$ s.c.v. Milzen (3.1.6) und ihrer Masse M erstellt (s. Ergebnisse Abs. 4.2.1). Mit Hilfe der die Eichgerade beschreibenden Gleichung

$$M = -0,485 \text{ g} + 0,972 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \times b \times l$$

kann die Masse jeder einzelnen s.c.v. Milz nach Messung ihres $b \times l$ Produktes berechnet werden.

Als nächste Größe wurde die Dichte der kernhaltigen Zellen im Milzgewebe (g) bestimmt. Sie ist definiert als die Anzahl der Zellen (n), die in einer bestimmten Milzmasse (m) enthalten ist.

$$g = \frac{n}{m}$$

Vor und nach der Feinnadelpunktion der Milz wurde die Spritze mit der fest aufgesetzten Spinalnadel mit einer Präzisionswaage¹⁾ gewogen und durch Differenzbildung beider Werte die Masse (m) der entnommenen Milzgewebeprobe ermittelt. Nach Suspendieren der Milzgewebeprobe und Lyse der Erythrozyten wurde die Konzentration der kernhaltigen Zellen (C) in der Suspension mit einem automatischen Zellenzählgerät²⁾ bestimmt. Multiplizieren des Suspensionsvolumens (V) mit der Zellkonzentration (C) ergibt die Zahl der in der aspirierten Milzgewebeprobe (m) enthaltenen Zellen (n).

Die Zelldichte in der Milz errechnet sich damit zu:

$$g = \frac{C \times V}{m}$$

Die in der Milz mit der Masse (M) enthaltene Zahl an Zellen (N) ergibt sich durch Multiplizieren der Zelldichte (g) mit der Milzmasse (M).

1) : Mettler H 51 AR, Mettler GmbH, 2 Giessen

2) : siehe Index 3) Seite 4

Zusammengefaßt errechnet sich die Zahl der kernhaltigen Zellen (N) in der Milz mit der Masse (M) zu:

$$N = g \times M = \frac{n}{m} \times M = \frac{C \times V}{m} \times M =$$

$$= \frac{C \times V}{m} \times (- 0,485 \text{ g} + 0,972 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \times b \times l)$$

Die Zahl einer bestimmten Milzzellart erhält man durch Multiplikation ihres licht- bzw. immunfluoreszenzmikroskopisch ermittelten prozentualen Anteils unter den Milzzellen mit der Zahl aller in der Milz enthaltenen Zellen (N).

3.1.11 Bestimmung des Blutleukozytenanteils im Milzaspirat

Bei der Entnahme der Milzgewebeprobe kann es durch die Aspiration von Blut zur "Verunreinigung" der Biopsie kommen. Zu den Leukozyten des Milzparenchyms (L_{par}) mischen sich die aus dem aspirierten Blut stammenden Leukozyten (L_{blut}). Die nach Suspendieren der Milzgewebeprobe in der Suspension enthaltenen Leukozyten ($L_{\text{gesamt}}=L_{\text{ges}}$) setzen sich, sofern Blut aspiriert wurde, aus den Leukozyten des Milzparenchyms und den Leukozyten des Blutes zusammen.

$$L_{\text{ges}} = L_{\text{par}} + L_{\text{blut}}$$

Zur Berechnung der pro ul Suspension enthaltenen Leukozyten, die aus dem Blut stammen ($L_{\text{blut/ul}}$), wurde die pro ul Suspension enthaltene Erythrozytenzahl ($E_{\text{sus/ul}}$) bestimmt. Durch Multiplizieren von $E_{\text{sus/ul}}$ mit dem im Blut bestimmten Leukozyten zu Erythrozyten - Verhältnis L/E ergibt sich die pro ul Suspension enthaltene Zahl an Leukozyten, die durch Aspiration von Blut bei der Entnahme der Milzgewebeprobe beige-mischt wurde.

$$L_{\text{blut/ul}} = \frac{L}{E} \times E_{\text{sus/ul}}$$

Der Anteil der Blutleukozyten im Milzaspirat berechnet sich zu:

$$\frac{L_{\text{blut/ul}}}{L_{\text{ges/ul}}}$$

3.1.12.1 Messung der Chemilumineszenzaktivität (CA) der Milzzellen

Die Messung der CA von Milzzellen wurde modifiziert nach einer in der Arbeitsanleitung Chemilumineszenz (19) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurden den nach Feinnadel-punktion erhaltenen Milzzellsuspensionen (3.1.4) Volumina entnommen, die bei der ersten Meßserie 1×10^5 Zellen und bei der zweiten Meßserie 2×10^5 Zellen enthielten. Da die Zellkonzentrationen in den Milzzellsuspensionen immer über 4×10^5 Zellen/ml lagen, waren die entnommenen Volumina stets kleiner als 0,5 ml. In 3 ml Meßküvetten wurde die Zellsuspension mit heparinisierte HBSS-Lösung (50 I.E. Heparin/ml) auf ein Volumen von 500 ul eingestellt. Nach Zusatz von 10 ul einer 0,2 %-igen Luminollösung¹⁾ wurden die Röhrchen in die Meßkammer des Biolumat LB 950 T²⁾ gegeben und mit der Registrierung der CA (cpm) begonnen. Die Luminollösung wurde durch Lösen von 4 mg Luminol in 1 ml DMSO³⁾ und anschließender Verdünnung mit Aqua dest. auf 0,2 % erhalten. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurden 10 ul einer 5 %-igen, nicht opsonierten Zymosansuspension⁴⁾ dem Meßansatz hinzugegeben, kurz aufgeschüttelt und das Röhrchen bei fortlaufender Registrierung der CA über einen Einkanalschreiber⁵⁾ in die

1) : Uvasol Best. Nr. 4, Merck Darmstadt

2) : Fa. Berthold, Wildbad

3) : Dimethylsulfoxid, Best. Nr. 2931, Merck, Darmstadt

4) : Best. Nr. 4250, Sigma

5) : Kompensograph X-T, Siemens

Meßkammer zurückgegeben. Die Zymosansuspension wurde durch Dispergieren von 500 mg in 10 ml HBSS-Lösung und anschließendem Erhitzen im Wasserbad auf 90°C für 30 Minuten hergestellt. Für die längerdauernde Aufbewahrung wurde die Zymosansuspension portioniert bei - 20°C eingefroren, für den kurzfristigen Verbrauch ebenso wie die Luminollösung bei 4°C aufbewahrt. In Abb. 4 ist die Änderung der luminolverstärkten CA von Milzzellen vor und nach Zusatz von nicht opsoniertem Zymosan schematisch dargestellt.

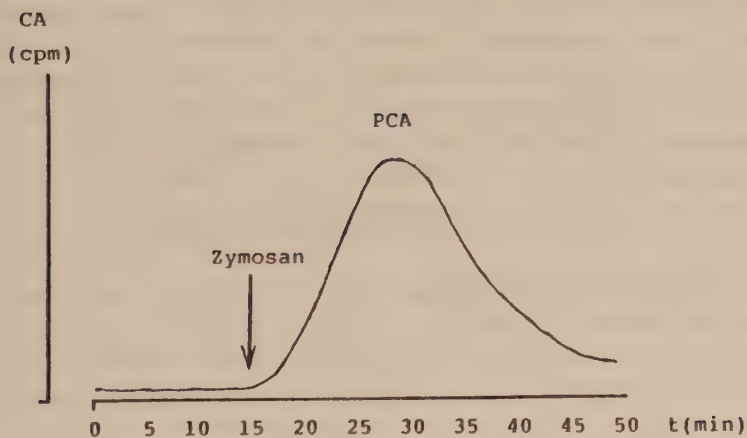


Abb. 4: Schematische Darstellung einer luminolverstärkten und zymosaninduzierten Chemilumineszenzmessung. In den Versuchen wurde das Chemilumineszenzaktivitätsmaximum (Peakchemilumineszenzaktivität PCA) ausgewertet.

3.1.12.2 Einfluß von humoralen Faktoren auf die CA der Milzzellen

Aufgrund der geringen Zellausbeute bei der Feinnadelaspirationstechnik (durchschnittlich 3×10^6 Zellen pro Punktion) wurde die CA-Messung direkt mit den Milzzellsuspensionen durchgeführt. Ein vorheriges Waschen der Zellen wurde unterlassen, um einen weiteren Zellverlust zu vermeiden. In den Milzzellsuspensionen waren auch humorale Faktoren der Milz. Deren Einfluß auf die CA der Milzzellen sollte in Verdünnungsversuchen überprüft werden (Abb. 5). Durch Zentrifugieren der Milzzellsuspension wurde zellfreier Überstand gewonnen. Von diesem wurden mit heparinisierte HBSS-Lösung Verdünnungen hergestellt. Nach zweifachem Waschen der Milzzellen mit heparinisierte HBSS-Lösung konnten sehr kleine Volumina gereinigter Milzzellen gleicher Zusammensetzung auf sechs Meßröhrchen aufgeteilt werden. Den Röhrchen wurden die verschiedenen Verdünnungen des Überstands ad 500 μ l hinzugesetzt und die Chemilumineszenzaktivität der Zellen wie oben beschrieben in den sechs Röhrchen simultan in einem 6-Kanal Biolumaten LB 9505¹⁾ rechnergestützt²⁾ gemessen. Die Ergebnisse wurden auf einem Matrixdrucker³⁾ ausgedruckt.

1) : Fa. Berthold, Wildbad

2) : Apple IIe, Apple Computer, Cupertino, USA

3) : RX, Epson, Nagano-Ken, Japan

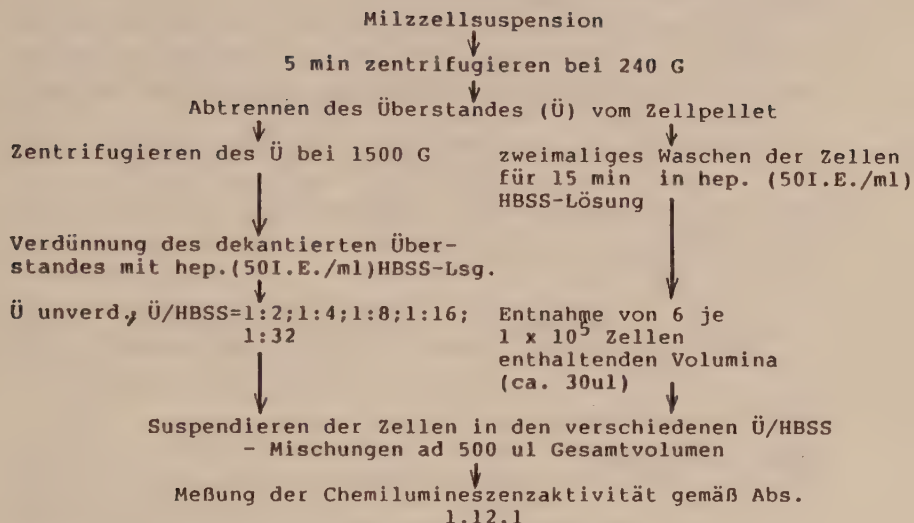


Abb. 5: Einzelschritte der Verdünnungsversuche
Bei unverändertem Meßansatz (gleiche Zahl und Zusammensetzung der Milzzellen, gleiche Zymosan- und Luminolmengen) wurde die Konzentration der im Überstand enthaltenen humoralen Faktoren variiert.

3.1.13 Differentialblutbild und Leukozytenzählung

Aus der Schwanzvene der Tiere wurde ein Blutropfen (ca. 40 ul) auf einen Objektträger aufgebracht und ausgestrichen. Nach Lufttrocknen und Färben des Blutausriches nach Pappenheim wurden jeweils 100 Leukozyten unter einem Universalmikroskop¹⁾ bei 1200-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Leukozytenzahl pro ul Blut wurde mit einem Zellenzählgerät²⁾ bestimmt. Multiplizieren der lichtmikroskopisch ermittelten Prozentsätze mit der Leukozytenkonzentration ergab die Konzentration der jeweiligen Zellart im Blut.

1) : siehe Index 2) Seite 7

2) : siehe Index 3) Seite 4

3.1.14 Messung des Tumorwachstums

Prinzipiell kann jede normale oder maligne Zellpopulation in dynamischer Form entsprechend Abbildung 6 dargestellt werden.

Zellen

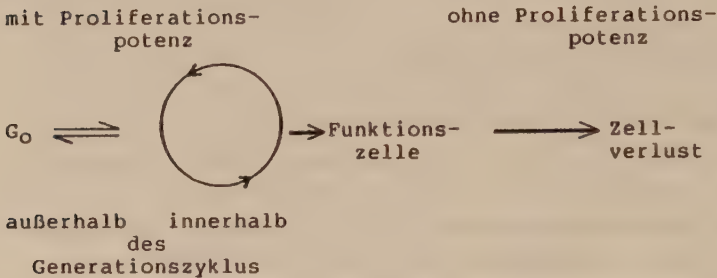


Abb. 6: Proliferationskinetische Zustände von Zellen in einem malignen Zellsystem

Danach werden Zellen mit oder ohne Proliferationspotenz unterschieden. Zellen mit Proliferationspotenz können sich im Generationszyklus oder in der Ruhephase G_0 befinden. Das Verhältnis der Zellen im Zyklus bezogen auf die Zellen mit Proliferationspotenz heißt Wachstumsfraktion. Irreversibler Teilungsverlust führt zu Zellen ohne Proliferationspotenz. Nach Ablauf ihrer limitierten Lebenszeit gehen sie dem Zellsystem verloren. Das makroskopisch expansive Wachstum eines Tumors ist gemäß diesem Modell ein Bilanzergebnis zwischen der Größe der Zellproduktion und des Zellverlustes. Neoplastisches Wachstum kann demnach auf einer im Vergleich zu gesundem Muttergewebe erhöhten Zellproduktion oder verringertem Zellverlust beruhen. Eine gesteigerte Zellproduktion wäre sowohl durch Vergrößerung der Wachstumsfraktion, als auch durch Verkürzung der Generationszeit möglich. Betrachtet man der Einfachheit halber nur die Zellen im Generationszyklus,

so läßt sich ihre Zahl in Abhängigkeit von der Dauer des Tumorstwachstums durch eine Exponentialfunktion beschreiben.

$$N(t) = N(t_0) \times e^{k_1 \times t}, \text{ wobei } k_1 = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

$N(t)$ = Zahl der sich im Generationszyklus bis zum Zeitpunkt t des Tumorstwachstums mitotisch geteilten Zellen

$N(t_0)$ = Zahl der sich im Generationszyklus bis zum fiktiven Zeitpunkt 0 des Tumorstwachstums mitotisch geteilten Zellen

k_1 = Zellteilungskonstante

$T_{1/2}$ = Generationszeit, Zeit zwischen zwei Zellteilungen

t = Dauer des Tumorstwachstums

Ebenso wie die Tumorzellzahl exponentiell anwächst, nimmt auch das Tumorstvolumen zumindest in der ersten Zeit des Tumorstwachstums exponentiell zu.

$$V(t) = V(t_0) \times e^{k_2 \times t}, \text{ wobei } k_2 = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

$V(t)$ = Tumorstvolumen zum Zeitpunkt t

$V(t_0)$ = Tumorstvolumen zum fiktiven Zeitpunkt 0

k_2 = Wachstumsquote

$T_{1/2}$ = Tumorstvolumenverdoppelungszeit

t = Dauer des Tumorstwachstums

Allerdings steigt mit andauerndem Tumorstwachstum die Tumorstvolumenverdopplungszeit an, als Ausdruck einer abnehmenden Wachstumsquote k . Die in Tierexperimenten gefundene Zeitabhängigkeit von k wird durch die Gompertzsche Gleichung beschrieben (98). Verantwortlich für die Abnahme von k mit fortschreitendem Tumorstwachstum ist eine stetige Abnahme der Wachstumsfraktion und ein wachsender Zellverlust durch Metastasierung und Zellnekrose. Diese relativ leicht zu ermittelnde Wachstumsquote " k " eignet sich gut das Bilanzergebnis "Wachstum" zu beschreiben.

Durch Umformen der Gleichung $V(t) = V(t_0) \times e^{k \times t}$ berechnet sich k zu:

$$\bar{k}(t-t_0) = \frac{1}{t-t_0} \times \ln \frac{V(t)}{V(t_0)}$$

Dabei ist $\bar{k}(t-t_0)$ die mittlere Wachstumsquote (mWq) einer Exponentialfunktion, die das Tumorwachstum in der Zeit von t_0 bis t beschreibt. In den Versuchen wurde das Tumorwachstum durch Berechnung der mWq $\bar{k}(t-t_0)$ in Abhängigkeit des einseitig variierenden Zeitintervalls $t-t_0$ beurteilt ($t_0 = \text{const.}$; t variiert). Eine Abnahme der für ein Zeitintervall t_2-t_0 berechneten mWq gegenüber der für das vorangehende kleinere Zeitintervall t_1-t_0 ($t_2 > t_1 > t_0$) berechneten mWq zeigt an, daß die momentanen Wachstumsquoten $\dot{k}(t)$, d.h. die Geschwindigkeiten, mit denen der Tumor im Zeitintervall t_1 bis t_2 wuchs, im Mittel gegenüber den momentanen Wachstumsquoten des Zeitintervalls t_0-t_1 abgenommen haben. Umgekehrt zeigt eine Zunahme der mWq, die zu einem nach t_1 folgenden Zeitpunkt t_2 berechnet wurde, gegenüber der zu t_1 berechneten mWq, eine Zunahme der momentanen Wachstumsquoten des Tumors im Zeitraum t_1-t_2 an. Durch das angewandte Verfahren, die Berechnung der mWq $\bar{k}$ in Abhängigkeit von der Zeit, ist es auf indirekte Weise möglich, Veränderungen von $\dot{k}$ und damit der Tumorstadiumwachstumsgeschwindigkeit sensibel zu erfassen.

3.1.15 Überprüfung der Spezifität der Zellveränderungen in s.c.v. Milzen

3.1.15.1 Zellveränderungen in intraabdominal gelegenen (i.a.g.) Milzen

Für die Untersuchung i.a.g. Milzen wurden die Organe entfernt. Da für die Bearbeitung der zweiten Fragestellung (Abs. 3.2) Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeiten vor und nach Tumorinokulation splenektomiert wurden, dienten die Zellveränderungen dieser bis zu ihrer Entfernung i.a.g. Organe als Kontrolle für die Veränderungen der s.c.v. Milzen aus Versuch 4 (Abs. 3.1). Sowohl im Splenektomieversuch, als auch in Versuch 4 wurden weibliche, gleich alte NRMI-Mäuse verwendet, die annähernd die gleichen Zahlen an Lewis Lung Tumorzellen subkutan injiziert bekamen. Auch stimmten in beiden Versuchen die durchschnittlichen Tumorstadiumsgeschwindigkeiten und die Überlebenszeiten der Tiere nach Tumorinokulation überein.

3.1.15.2 Zellveränderungen in s.c.v. Milzen durch Inokulation von Tumorzellhomogenaten

Für die Herstellung der Tumorphomogenate wurden 4×10^7 Lewis Lung Tumorzellen fünf weiblichen NRMI-Mäusen subkutan inokuliert. 17 Tage später konnten Tumoren ohne Nekrosen entfernt werden. Nach Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:4 zum Tumorgewicht wurden die Tumoren mit einem Homogenisator¹⁾ bei 15000 U/min unter Kühlung zerkleinert. Anschließend nach portionieren in kleinere Plastikröhrchen wurden die Homogenate durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und in 40°C warmen Wasser wieder vollständig aufgetaut. Das Einfrieren und Auftauen wurde einmal

1) : Ultraturax

wiederholt und schließlich die Homogenate nach nochmaligem Tieffrieren in flüssigem Stickstoff im Kühlschrank bei (-80°C) bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für die Bestimmung der pro mg Tumorphomogenat proportionalen Tumorzellzahl wurde die Zelldichte in den einzelnen Tumoren nach der gleichen Methode ermittelt, wie sie für die Bestimmung der Zelldichte in der Milz Anwendung fand (Abs. 3.1.10). Der für die fünf Tumoren berechnete Mittelwert der Tumorzelldichte erniedrigte sich jedoch für die pro mg Tumorphomogenat proportionale, mittlere Tumorzellzahl um $1/4$, da vor dem Homogenisieren der Tumoren ein Viertel ihres Gewichtes an physiologischer Kochsalzlösung hinzugesetzt wurde.

Die Dosierung der Tumorzellhomogenate sollte der Größe des Zellzerfalls beim natürlichen Tumorstadium entsprechen. Gemäß dem dynamischen Tumormodell (3.1.14) kann das Wachstum von Tumoren als ein Bilanzergebnis zwischen der Geschwindigkeit der Zellneubildung und des Zellverlustes aufgefaßt werden. Weiterhin besteht für die Geschwindigkeit der Tumorzellbildung, als auch für die des Zellverlustes Proportionalität zur vorhandenen Tumorzellzahl (170, 171). In Formeln ausgedrückt, ergibt sich:

$$\dot{N} = \dot{N}_w - \dot{N}_v ; \quad \dot{N}_w = k_w \times N ; \quad \dot{N}_v = k_v \times N ;$$

$$\dot{N} = (k_w - k_v) \times N ;$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung lautet:

$$N(t) = N(t_0) \times e^{(k_w - k_v) \times t} ;$$

$\dot{N}$ = Wachstumsgeschwindigkeit der Zahl tatsächlich vorhandener Tumorzellen

$\dot{N}_w$ = Zellbildungsgeschwindigkeit

$\dot{N}_v$ = Zellverlustgeschwindigkeit

N = Tumorzellzahl

k_w = Wachstumsquote

k_v = Verlustquote

Die Zahl der bis zum Zeitpunkt (t) des Tumorwachstum verloren gegangenen Zellen $N_v(t)$ kann aus der Differenz der bis zur Zeit (t) durch Proliferation gebildeten Zellzahl

$N(t_0) \times e^{k_w \times t}$ und der zur Zeit (t) tatsächlich vorhandenen Zellzahl $N(t_0) \times e^{(k_w - k_v) \times t}$ berechnet werden.

$$\begin{aligned} N(t) &= N(t_0) \times e^{k_w \times t} - N(t_0) \times e^{(k_w - k_v) \times t} = \\ &= N(t_0) \times e^{k_w \times t} \times (1 - e^{-k_v \times t}) ; \end{aligned}$$

Dieses Modell beschreibt mit den für k_v und k_w einzusetzen- den, konstanten Größen den Zellverlust aus einem unter optimalen Bedingungen wachsenden Tumor, für den während des Tumorwachstums die Wachstumsfraktion (p), die Generations- zeit(t_c) ($k_w = \frac{\ln(1+p)}{t_c} = \text{const.}$) der proliferierenden

Zellen und die Zellverlustrate konstant bleiben.

Simpson - Herren & Lloyd (160) ermittelten für das Lewis Lung Carcinom eine Generationszeit(t_c) von 22 Stunden (=0,917 d), eine Wachstumsfraktion(p) von 42 % und eine Zellverlustquote von 35 %. Aus diesen Daten berechnet sich für

$$k_w = \frac{\ln(1 + 0,42)}{0,917 \text{ d}} = 0,38239 \text{ d}^{-1} \text{ und für}$$

$$k_v = 0,35 \times k_w = 0,1338 \text{ d}^{-1}.$$

Für die Abschätzung des Tumorzellverlustes, wie er während des Lewis Lung Tumorwachstums in Versuch 3 erfolgte, wurde neben diesen, der Literatur entnommenen Werte für k_w und k_v noch die Zahl der inokulierten Tumorzellen $N(t_0)$ in die oben stehende Formel eingesetzt. In Versuch 3 wurden $3,7 \times 10^7$ Tumorzellen inokuliert. Da ca. nur 10 % der Zellen vital waren, beträgt $N(t_0) = 3,7 \times 10^6$ Zellen. Die restlichen 90 %, d. h. $3,33 \times 10^7$ Zellen zerfielen an der Injektionsstelle.

Zur Simulation der Freisetzung von Tumormaterial wurde eine zum avitalen Teil der inokulierten Zellen äquivalente Menge homogenisierter Tumorzellen am Tag 0 zusätzlich zur exponentiellen Applikationweise verabreicht. Entsprechend der Formel zur Berechnung des Tumorzellverlustes ergeben sich die in Tabelle 1 aufgeführten, täglich subkutan injizierten Dosen an homogenisiertem Tumormaterial.

Tab. 1: Dosen subkutan applizierter Tumorhomogenate (mg)

Tag	:	0	1	2	3	4	5	6	7
Homogenatmenge	:	108,8	2,2	6,1	12,6	23,1	39,9	66,2	106,9

Tag	:	8	9	10	11
Homogenatmenge	:	169,3	264,8	408,6	625,3

3.2 Splenektomie und Scheinoperation von Mäusen mit verschiedenen Tumorstadien

3.2.1 Splenektomie und Scheinoperation

Unter Äthernarkose wurden die Tiere auf ihrer linken Seite subkostal laparotomiert. Nach mobilisieren der Milz aus der Abdominalhöhle wurden die zur Milz ziehenden Gefäße hilusnah unterbunden und distal der Unterbindung durchtrennt. Die Gefäßstümpfe wurden in das Abdomen zurückgeschoben und die Muskellücke durch zwei Einzelknopfnähte verschlossen. Mit drei weiteren Nähten wurde der darüberliegende Hautschnitt adaptiert. Die Scheinoperation wurde auf die gleiche Weise wie die Splenektomie ausgeführt, ohne jedoch die zur Milz ziehenden Gefäße zu unterbinden und das Organ zu entfernen.

3.3 Statistik

Die Prüfung der Werte auf ihre Normalverteilung erfolgte anhand des David-Quotienten. Der Vergleich zweier Stichproben wurde mit Hilfe des U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde für den einseitigen Test bei $p < 0,05$ angesetzt. In den Abbildungen sind Wertegruppen, für die signifikante Unterschiede vorliegen, jeweils mit dem gleichen Symbol (*) gekennzeichnet. Sind mehr als zwei aufeinanderfolgende Wertegruppen mit dem gleichen Symbol gekennzeichnet, so bestehen signifikante Unterschiede nur zwischen den unmittelbar nebeneinanderliegenden Wertegruppen. Als Maßzahl für die Stärke und Richtung eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Variablen wurde der Korrelationskoeffizient berechnet. Bei seiner Prüfung im einseitigen Test wurde die Signifikanzschwelle auf $p < 0,05$ festgelegt. Im Falle einer fraglichen Gemeinsamkeitskorrelation, d. h. die Beziehung zweier Größen beruht auf ihrer Abhängigkeit zu einer dritten Größe, wurde der partielle Korrelationskoeffizient berechnet. Er gibt den tatsächlichen Grad der Abhängigkeit zwischen den jeweils interessierenden zwei Größen an, wenn die dritte Größe konstant gehalten wird (148).

4. Ergebnisse

4.1 Prozentuale Zellveränderungen in der Milz und im Blut vor und nach LL-Tumordinokulation

4.1.1 Splenogramme s.c.v. Milzen

Nach LL-Tumordinokulation fallen die Lymphozyten in der Milz auf $1/5$ bis $1/6$ der normalen Ausgangswerte ab (Abb. 7).

Die reifen Granulozyten erreichen umgekehrt hierzu einen Höchstwert und nehmen danach ab (Abb. 8).

Die unreifen Zellformen der Granulopoese steigen kontinuierlich bis zum Tod der Tiere an. Sie überwiegen schließlich die reifen Granulozyten (vgl. Abb. 9 mit Abb. 8).

Die erythropoetischen Zellformen steigen nach Tumordinokulation zunächst an, fallen zum Zeitpunkt höchster Granulozytenwerte (Tag 14) ab, um auf Endwerte, die knapp unter dem Doppelten der Normalwerte liegen, erneut anzusteigen (Abb. 10).

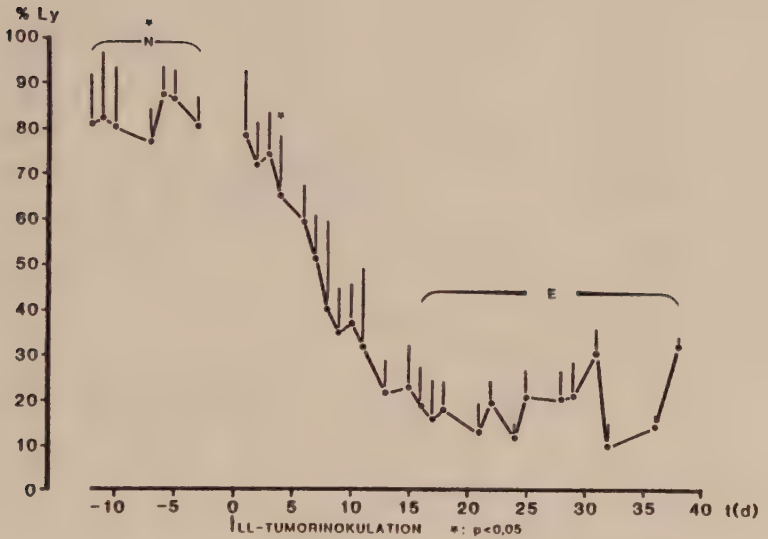


Abb. 7: Lymphozyten (Ly) im Milzaspirat tumortragender Mäuse in % (n=9♀) Versuch 1. Die Versuche 2, 3 und 4 sind auch für alle nachfolgenden graphisch dargestellten Ergebnisse im Tabellenanhang aufgeführt. In den Abbildungen wurden mit Symbolen Zeiträume (N, E) bzw. Zeitpunkte (Min, Max) gekennzeichnet, in - bzw. an welchen erhobene Einzelwerte für die Berechnung der in den Tabellen aufgelisteten mit den gleichen Symbolen abgekürzten Mittelwerte dienten.

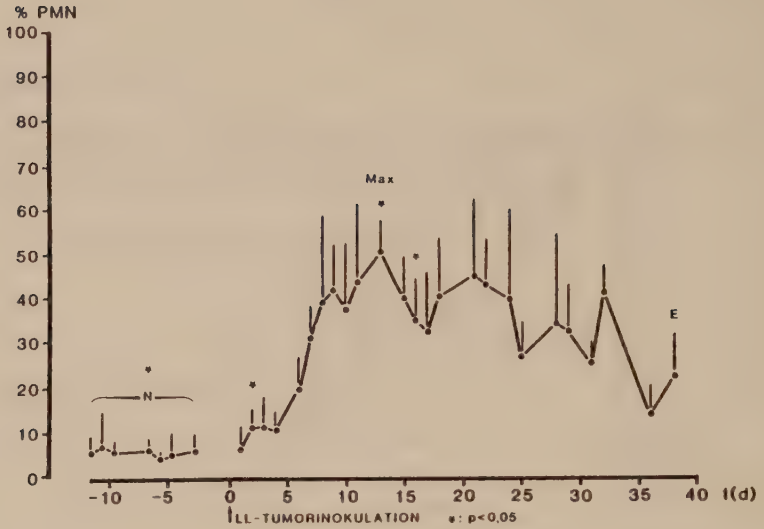


Abb. 8: Versuch 1 (n = 9 ♀)

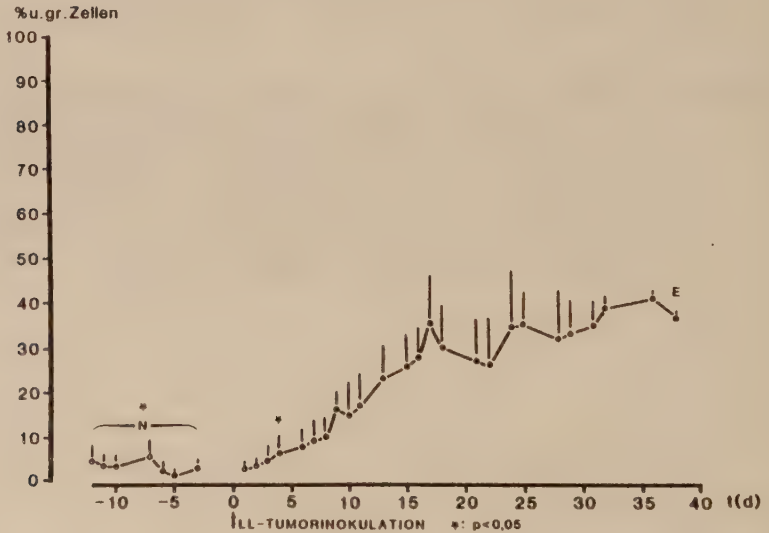


Abb. 9: Versuch 1 (n = 9 ♀)

Abb. 8 und 9: Segmentkernige Granulozyten (PMN) und unreife granulopoetische Zellen (u.gr. Zellen) im Milzaspirat tumortragender Mäuse in %

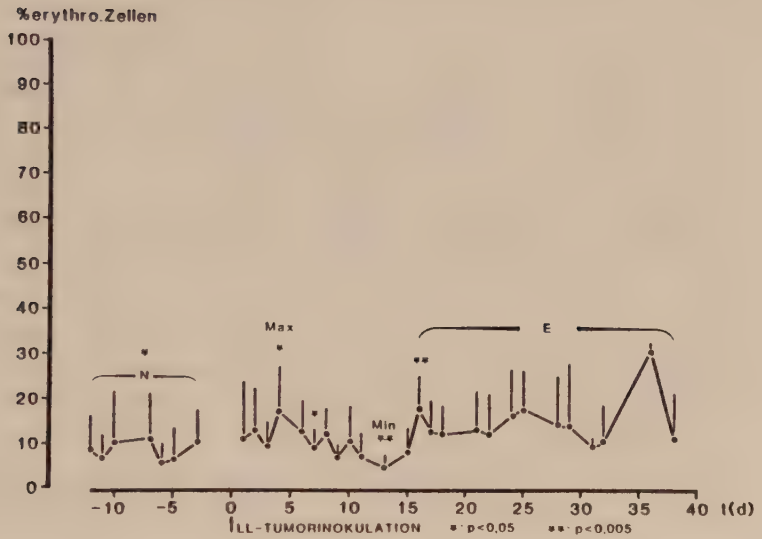


Abb. 10: Versuch 1 - Erythropoetische Zellen (erythro. Zellen) im Milzaspirat tumortragender Mäuse in % (n = 9 ♀)

4.1.2 Immunfluoreszenzmikroskopisch differenzierte Milzzellen

Zwei bis drei Tage nach LL-Tumorinokulation steigen die prozentualen Anteile Ig + und IgG + Zellen an. An den Tagen fünf bis elf fallen sie auf Tiefstwerte ab. Danach werden periodisch maximale und minimale Werte erreicht (Abb. 11 und 12).

Umgekehrt zu den Veränderungen der prozentualen Anteile Ig und IgG + Zellen verläuft die Entwicklung des prozentualen Anteils Thy 1.2 + Zellen im Milzaspirat (Tab. 2). An den Tagen der Höchstwerte für die Ig und IgG + Zellen liegen die prozentualen Anteile Thy 1.2 + Zellen im Milzaspirat bei Tiefstwerten. Danach folgt ein Anstieg auf Höchstwerte zu den Zeiten minimaler Werte Ig und IgG tragender Milzzellen. Später nimmt in allen Versuchen der Anteil Thy 1.2 + Zellen unter den Milzzellen ab (In Tab. 2 nicht mehr dargestellt).

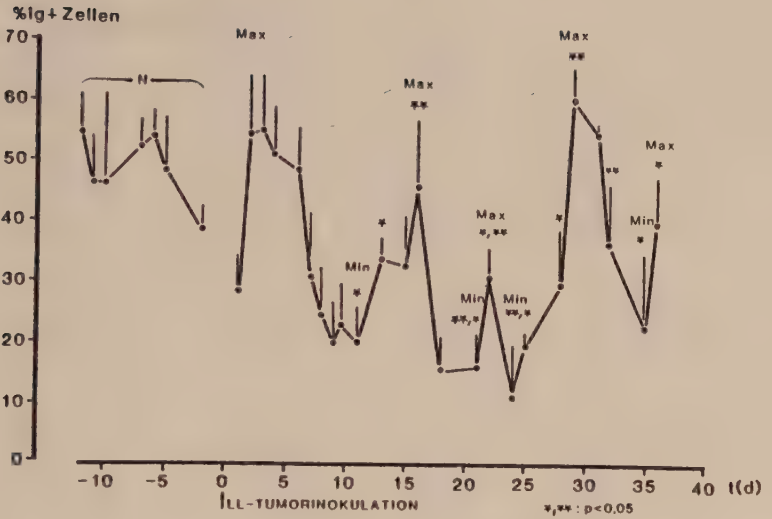


Abb. 11: Versuch 1 (n=9♀)

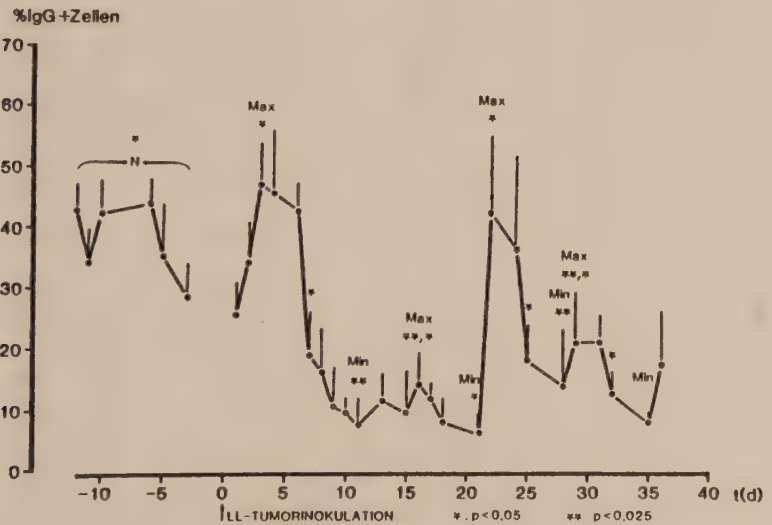


Abb. 12: Versuch 1 (n=9♀)

Abb. 11 und 12: Immunglobulin (Ig) und Immunglobulin G (IgG) + Zellen im Milzaspirat tumortragender Mäuse

Tab. 2: Anteile von Ig, IgG und Thy 1.2 + Zellen im Milzaspirat tumortragender Mäuse in %

Ig-Z.:	N	F1	Signifikanz bei	Max. Min	F1	Signifikanz bei	Min. Max
V2	31.9%±8.3%(n=26)	↗	Tag 3: (p<0.025)	44.8%±9.9%(n=9) Tag 3	↘	Tag 5: (p<0.005)	26.7% ± 8.4 % (n=27) Tag 5 bis 10
V3	34.1%±9.6%(n=26)	↗	Tag 2: (p<0.005)	53.3%±9.5%(n=8) Tag 2	↘	Tag 4: (p<0.05)	22.1%±4.9%(n=8) Tag 7
IgG-Z.:							
V2	23.8%±11.2%(n=50)	↗	Tag 3: (p<0.005)	39.1%±7.8%(n=9) Tag 3	↘	Tag 5: (p<0.005)	7.8%±4.8%(n=7) Tag 7
V3	26.6%±7.0%(n=16)	↗	Tag 2: (p<0.001)	45.4%±7.8%(n=8) Tag 2	↘	Tag 4: (p<0.01)	13.5%±6.0%(n=8) Tag 7
V4	24.7%±8.8%(n=10)	↗	Tag 2: (p<0.05)	36.0%±10.3%(n=5) Tag 2	↘	Tag 8: (p<0.005)	11.4%±6.3%(n=5) Tag 10
Thy 1.2+Z.:							
V2	25.8%±9.6%(n=21)	↘	Tag 5: (p<0.05)	13.8%±17.3%(n=6) Tag 5	↗	Tag 7: (p<0.025)	43.9%±29.9%(n=8) Tag 10
V3	22.6%±11.1%(n=16)	↘	Tag 2: (p<0.001)	10.9%±10.5%(n=8) Tag 6	↗	Tag 7: (p<0.025)	45.5%±128.9%(n=8) Tag 8
V4	28.6%±3.9%(n=4)	↘	Tag 4: (n.s.)	18.7%±18.1%(n=5) Tag 4	↗	Tag 8: (p<0.05)	40.7%±7.1%(n=5) Tag 8
N: Normalwerte	F1: Fluktuation	↗	Anstieg	↘	Abfall		

4.1.3 Differentialblutbilder

Nach LL-Tumorinokulation fallen die prozentualen Anteile der Lymphozyten im Blut kontinuierlich ab und erreichen Werte, die ca. 1/11 der normalen Ausgangswerte betragen. Im Vergleich zur Milz, in der die Lymphozyten nur auf 1/5 bis 1/6 der Normalwerte absinken, ist der Abfall der Lymphozyten im Blut noch ausgeprägter (Abb. 13).

Umgekehrt zur Abnahme der Lymphozyten steigen die segmentkernigen Granulozyten zunächst an, bleiben für einige Tage unverändert (Plateau) und nehmen dann nochmals zu (Abb. 14). Vor jedem Anstieg der segmentkernigen Granulozyten erreichen die granulopoetischen Zellformen des Reifungspools Höchstwerte (vgl. Abb. 14 mit Abb. 15). Somit gehen den Zunahmen der segmentkernigen Granulozyten jeweils Steigerungen der unreifen Formen voraus. Zu einem Überwiegen der unreifen granulopoetischen Zellformen über die segmentkernigen Granulozyten, wie dies in der Milz der Fall ist, kommt es nicht.

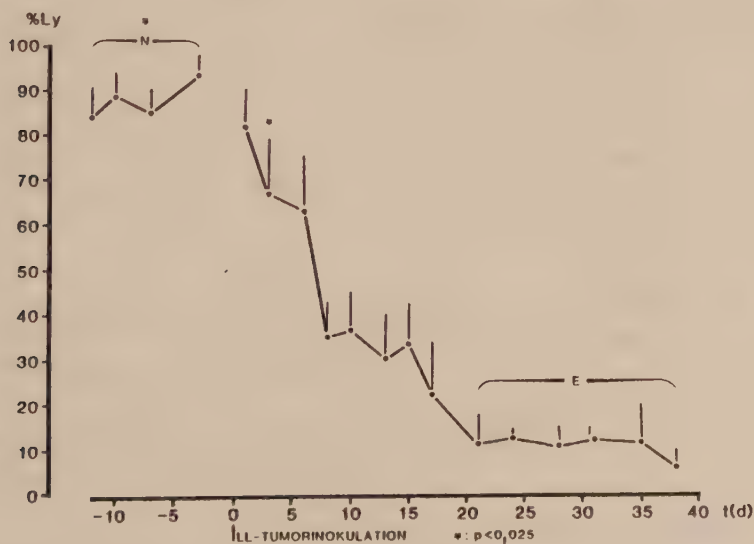


Abb. 13: Versuch 1 - Lymphozyten (Ly) im Blut tumortragender Mäuse in % (n=9 ♀)

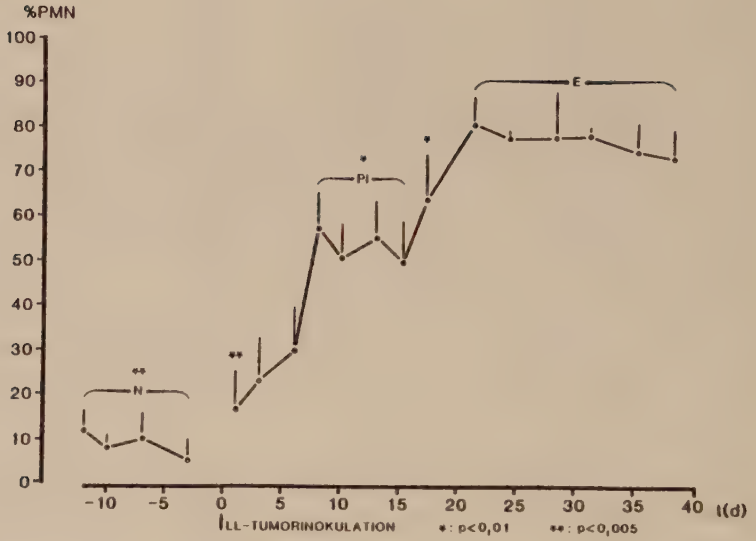


Abb.14: Versuch 1 (n = 9 ♀)

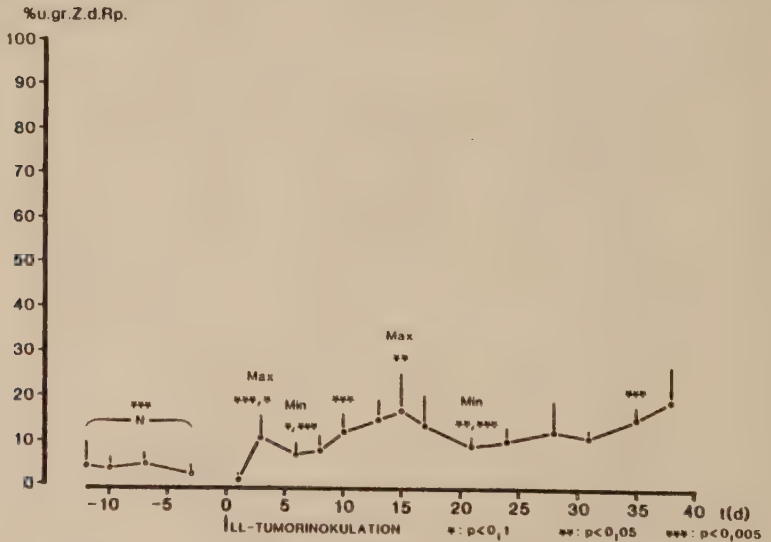


Abb.15: Versuch 1 (n = 9 ♀)

Abb.14 und 15: Segmentkernige Granulozyten (PMN) und unreife granulopoetische Zellen des Reifungspools (u. gr.Z.d.Rp.) im Blut tumortragender Mäuse in %

4.2 Absolute Zellveränderungen in der Milz und im Blut vor und nach LL-Tumorinokulation

4.2.1 Beziehung zwischen der Masse s.c.v. Milzen und ihrem $b \times l$ Produkt (b: Breite und l: Länge der Milz)

Die Masse s.c.v. Milzen ist ihrem Breite (b)-Länge(l)-Produkt direkt proportional (Abb. 16).

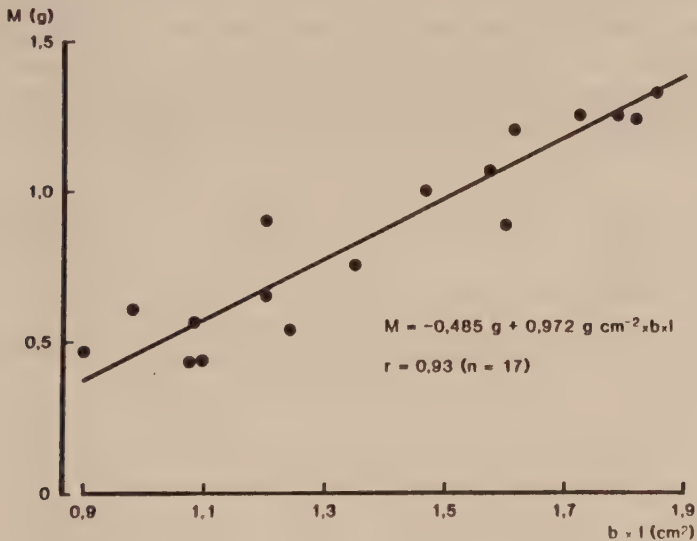


Abb. 16: Korrelation zwischen der Masse (M) s.c.v. Milzen und ihrem Produkt aus Breite (b) und Länge (l).

4.2.2 Masse, Zelldichte und absolute Zellzahlen s.c.v. Milzen

Das Milzgewicht steigt nach LL-Tumordinokulation an und fällt wieder ab (Abb. 17).

Zwei bis vier Tage nach der LL-Tumordinokulation sinkt die Dichte der Zellen in der Milz ab und steigt anschließend wieder an (Abb. 18).

Die Zahl der Zellen in der Milz nimmt aufgrund der zwei bis vier Tage nach der LL-Tumordinokulation absinkenden Milzzelldichte (Abb. 18) zunächst ab (Abb. 19). Bei steigendem Gewicht der Milz (Abb. 17) und wachsender Zelldichte (Abb. 18) wächst die Zellzahl in der Milz auf das Doppelte des Normalen an (Abb. 19).

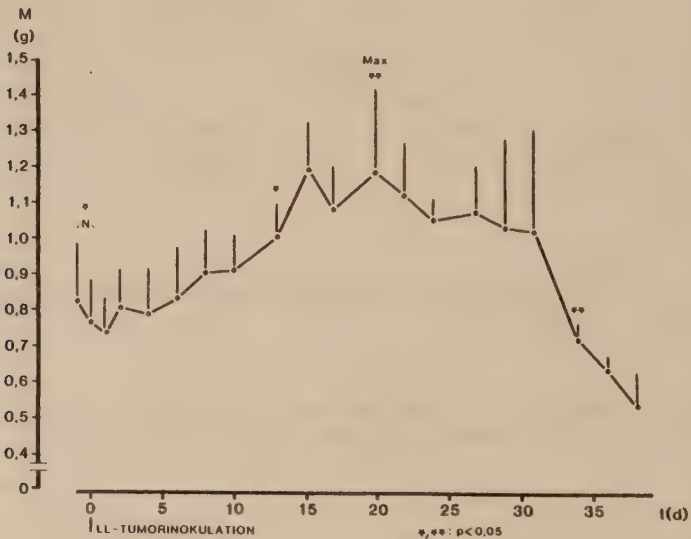


Abb. 17: Masse s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse Versuch 4 (n=5♀)

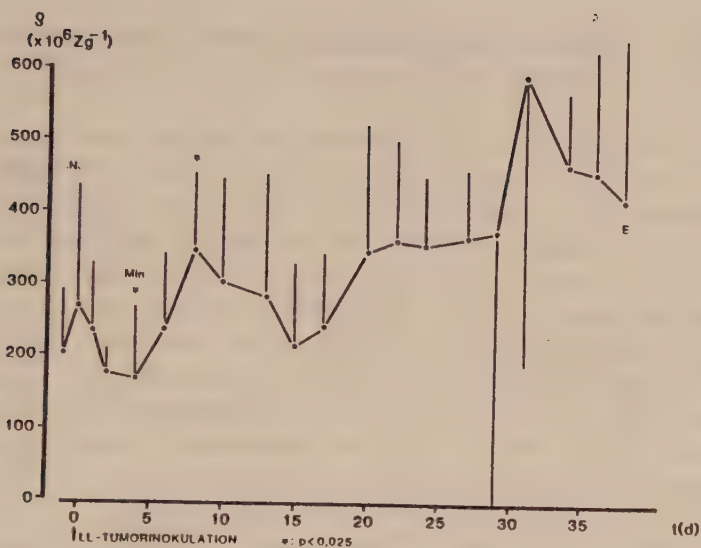


Abb. 18: Versuch 4 (n=5 ♀)

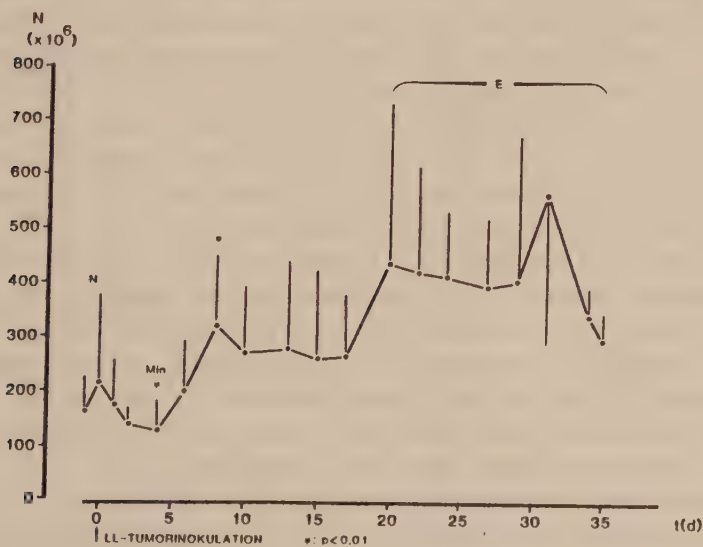


Abb. 19: Versuch 4 (n=5 ♀)

Abb.18 und 19: Zelldichte (g) und absolute Zellzahl (N) in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse

4.3.2 Absolute Zahlen licht- und immunfluoreszenzmikroskopisch differenzierter Milzzellen

Zwei bis vier Tage nach LL-Tumordinokulation verringert sich die Zahl der Lymphozyten in der Milz auf die Hälfte der Ausgangswerte. Sechs bis acht Tage nach Tumordinokulation steigt die Lymphozytenzahl auf die Höhe der normalen Werte an und fällt danach erneut ab. Neunzehn bis zwanzig Tage nach Tumordinokulation folgt ein zweiter Anstieg und hierauf eine endgültige Abnahme auf 1/3 bis 1/4 der Normalwerte (Abb. 20). Bei Vergleich von Abb. 19 und Abb. 20 zeigt sich, daß die zu Beginn des Tumorwachstums zu beobachtende Fluktuation der Gesamtzellzahl der Milz auf entsprechenden Veränderungen der Lymphozyten beruht.

Die Analyse der Lymphozytenpopulationen ergibt:

Die IgG + Zellen bleiben nach Tumordinokulation auf dem Normalwert zunächst unverändert (Abb. 21).

Die T-Zellpopulationen erreichen wiederum zwei bis vier Tage nach Tumordinokulation Minimalwerte. Es schließt sich um den achten Tag ein Maximum an. Nach Abnahme an den Tagen fünfzehn bis siebzehn folgt eine stark schwankende Zunahme der T-Zellpopulationen (Abb. 22 und 23).

Die in den ersten Tagen nach Tumordinokulation auftretenden Veränderungen der Gesamtzellzahl der Milz (Abb. 19) beruht somit auf entsprechenden Fluktuationen der T-Zellpopulationen, während die B-Zellen konstant bleiben.

In Umkehr zur Abnahme der Lymphozyten (Abb. 20) steigen die segmentkernigen Granulozyten gegenüber den normalen Ausgangswerten um das Dreißigfache an. Ihre Zahl fällt danach wieder ab, während die unreifen granulopoetischen Zellen des Reifungspools und des Proliferationspools bis zum Tod der Tiere kontinuierlich zunehmen und die segmentkernigen Granulozyten weit überwiegen (vgl. Abb. 24 mit Abb. 25).

Die Zunahme der Gesamtzellzahl der Milz im fortgeschrittenen Tumorstadium (Abb. 19) beruht somit auf der Vermehrung granulopoetischer Zellformen.

Die Zahl der erythropoetischen Zellen erhöht sich gegen Ende des Tumorwachstum auf das 1 1/2-fache des Normalen (Abb. 26).

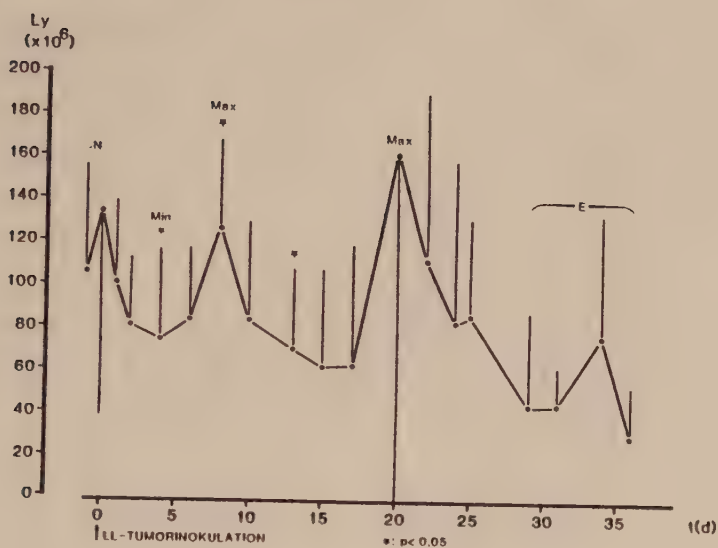


Abb. 20: Versuch 4 (n=5♀)

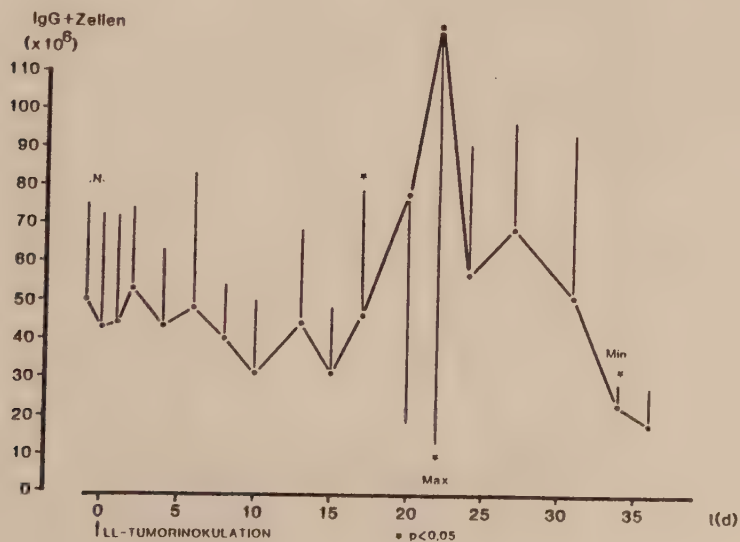


Abb. 21: Versuch 4 (n=5♀)

Abb.20 und 21: Lymphozyten (Ly) und Immunglobulin (IgG) + Zellen in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse

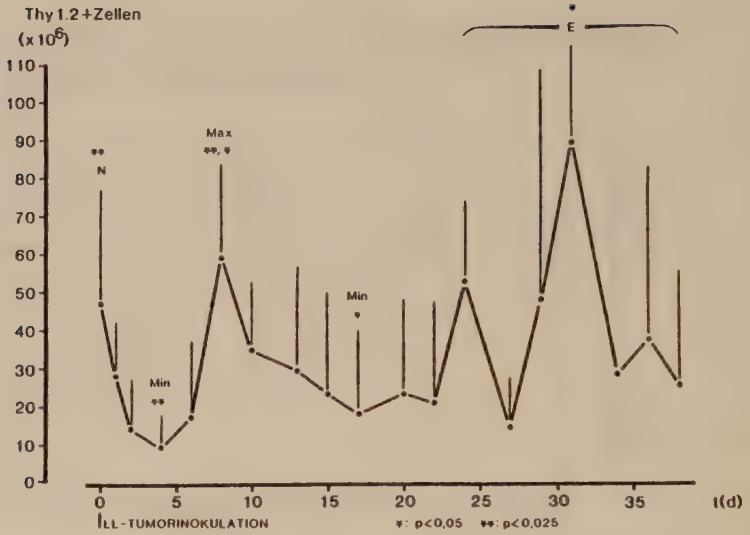


Abb. 22: Versuch 4 (n=5♀)

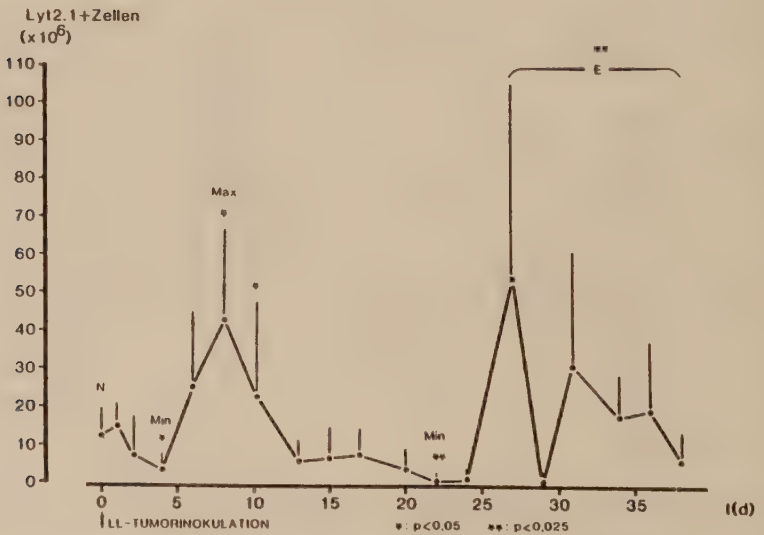


Abb. 23: Versuch 4 (n=5♀)

Abb. 22 und 23: Thy 1.2 und Lyt 2.1 + Zellen in s.c.v. Milzen
tumortragender Mäuse

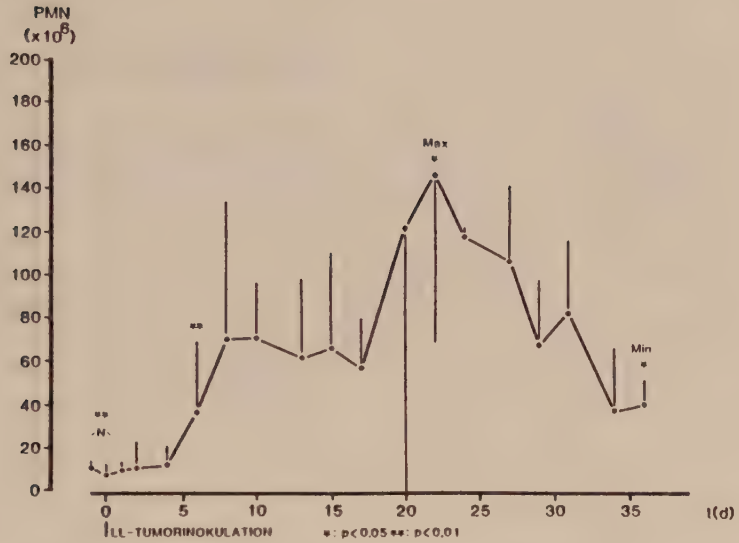


Abb. 24: Versuch 4 (n=5♀)

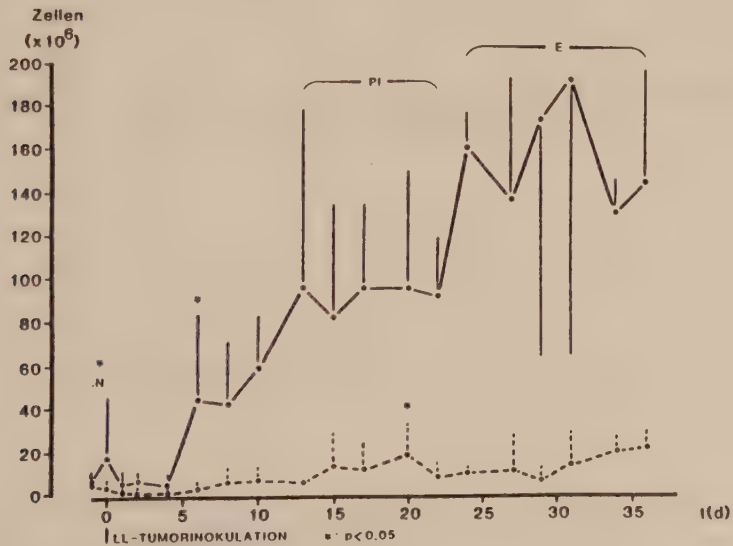


Abb. 25: Versuch 4 (n=5♀)

Abb. 24 und 25: Segmentkernige Granulozyten (PMN) und granulopoetische Zellen des Proliferations- (---) und des Reifungspools (—) in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse

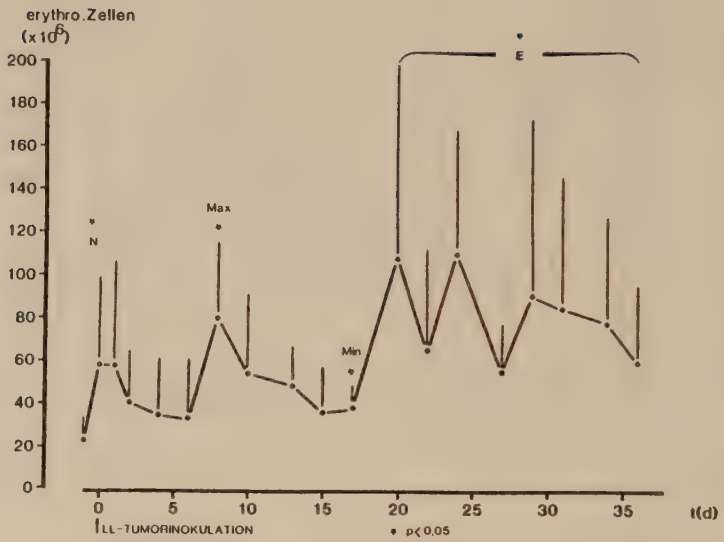


Abb. 26: Erythropoetische (erythro.) Zellen in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse, Versuch 4 ($n=5\varphi$)

4.2.4 Blutleukozytenzahlen

Kurze Zeit nach Tumorinokulation steigen die Lymphozyten im Blut stark an. Danach nehmen sie gegen Ende des Tumorstadiums kontinuierlich bis auf subnormale Werte ab. Erwähnenswert ist, daß die Lymphozyten das Maximum zu dem Zeitpunkt erreichen, an welchem die Zahl der Lymphozyten in der Milz am niedrigsten ist (vgl. Abb. 27 mit Abb. 20).

Die segmentkernigen Granulozyten und die granulopoetischen Zellen des Reifungspools steigen auf sehr hohe Werte an (Abb. 27).

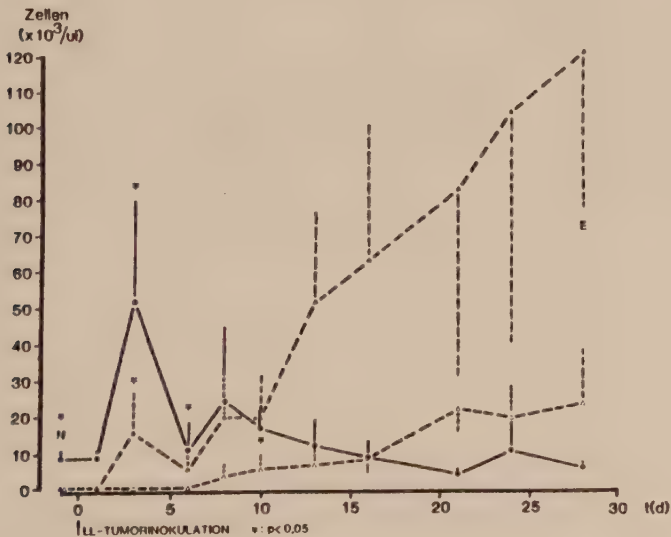


Abb. 27: Konzentration der Lymphozyten (•—•), der segmentkernigen Granulozyten (▲---) und der granulopoetischen Zellen des Reifungspools (Δ---) im Blut tumortragender Mäuse, Versuch 3 (n = 4 ♀)

4.2.5 Blutleukozytenzahl im Milzaspirat

Der Anteil der aus aspiriertem Blut stammenden Leukozyten (L_{blut}) unter den Leukozyten im Milzaspirat (L_{ges}) ist innerhalb der ersten zehn Tage nach Tumorinokulation vernachlässigbar klein. Erst bei fortgeschrittenem Tumorwachstum nimmt der Anteil der aus dem Milzparenchym stammenden Leukozyten (L_{par}) durch die Zunahme des Anteils der Blutleukozyten (L_{blut}) im Milzaspirat ab (Abb. 28).

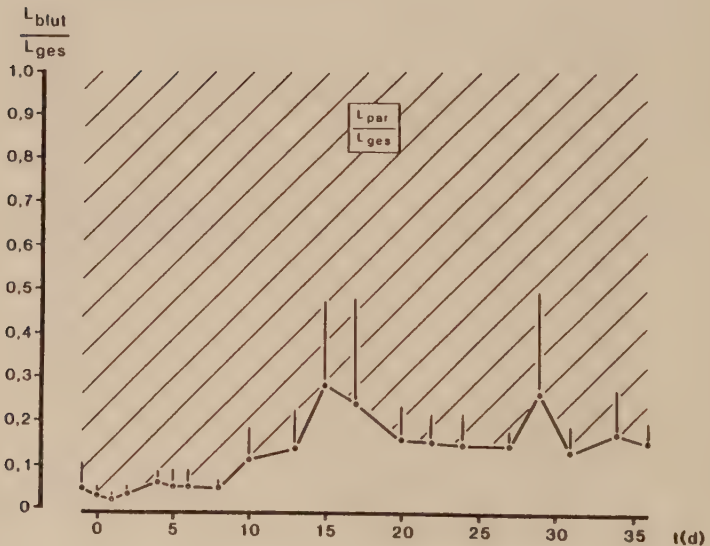


Abb. 28: Anteil der Blutleukozyten ($L_{\text{blut}}/L_{\text{ges}}$) und der dem Milzparenchym angehörigen Leukozyten ($L_{\text{par}}/L_{\text{ges}}$) im Milzaspirat ($L_{\text{ges}} = L_{\text{blut}} + L_{\text{par}}$), Versuch 4 ($n=5\varphi$)

4.3 Tumorkinetik

4.3.1 Zeitabhängigkeit der mittleren Quote $\bar{k}$ und BxL-Produkte der Lewis Lung Tumoren (B: Breite und L: Länge des Tumors)

Entsprechend den Ausführungen von 3.1.14 läßt sich aus Abb. 30 entnehmen, daß die Geschwindigkeit, mit der die Tumoren wachsen, von den beiden Zeiten maximaler mittlerer Wachstumsquoten ($t(\bar{k}_{Max1})$; $t(\bar{k}_{Max2})$) an abnimmt. Abb. 29 zeigt die Entwicklung der zum Volumen der Tumoren proportionalen BxL-Produkte.

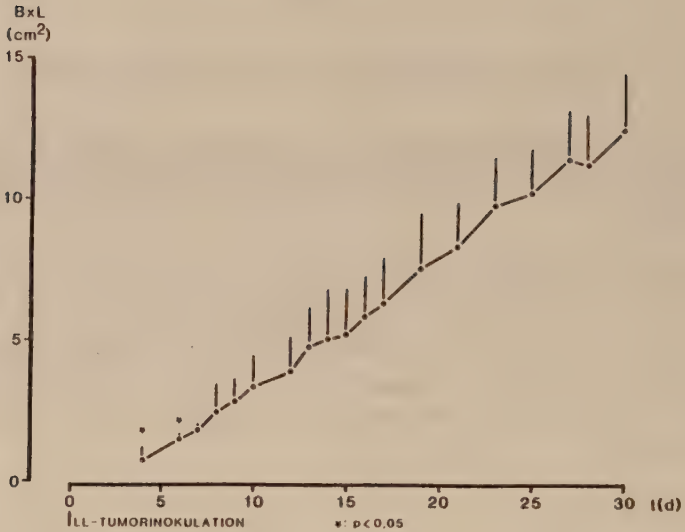


Abb. 29: Versuch 3 (n = 5 ♀)

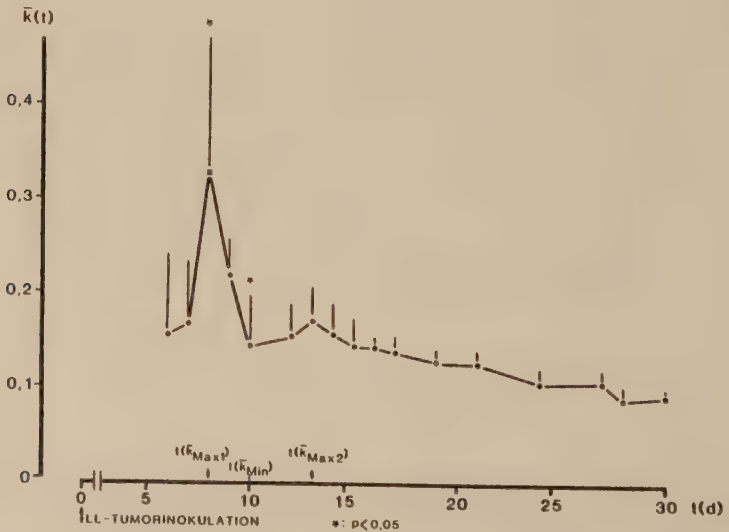


Abb. 30: Versuch 3 (n = 5 ♀)

Abb. 29 und 30: $B \times L$ -Produkte und mittlere Wachstumsquote $\bar{K}(t)$ von subkutan wachsenden Lewis Lung Tumoren

4.3.2 Beziehungen zwischen den Milzzellveränderungen und den Zeiten abnehmender Tumorstadiumsgeschwindigkeiten

Mit Hilfe der Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, daß sich das Wachstum der Tumoren um so früher verringert, je stärker (1) und je früher (2) die Granulopoese in der Milz nach Tumordinokulation auftritt.

(1)

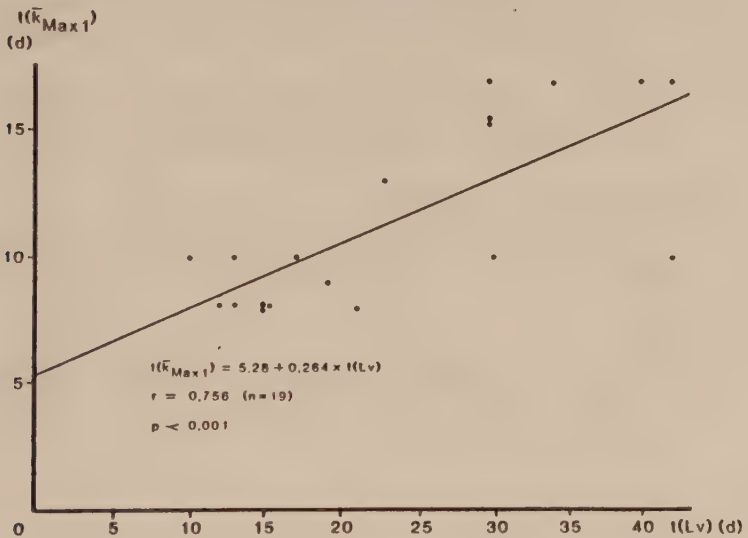


Abb. 31: Korrelation $t(\bar{K}_{Max1}) - t(Lv)$

$t(\bar{K}_{Max1})$: Zeit erstmaliger Abnahme der Tumorstadiumsgeschwindigkeit

$t(Lv)$: Zeit nach LL-Tumordinokulation, von der an unreife granulopoetische Zellformen die segmentkernigen Granulozyten im Splenogramm überwiegen.

(2) $t(\bar{K}_{Max1}) - t(\nearrow PMN)$: $r = 0,505$; $n = 19$; $p < 0,05$

je früher der Anstieg der Granulozyten ($t(\nearrow PMN)$) erfolgt, desto schneller verlangsamt sich das Tumorstadium

Da jede der in (1) und (2) zueinander in Beziehung gesetzten Größen auch zur durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit ($\bar{V}$) der Tumoren korreliert (3), (4), (5) wurden zum Ausschluß einer Gemeinsamkeitskorrelation als Ursache für die in (1) und (2) gefundenen Zusammenhänge die partiellen Korrelationen (6) berechnet.

(3) $t(\bar{K}_{\text{Max}1}) - \bar{V}: r = -0,569; n = 19; p < 0,01$

je größer die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit ($\bar{V}$) eines Tumors ist, desto früher verringert er sein Wachstum

$\bar{V}$ wurde aus dem zu 2/3 der Überlebenszeit gemessenen $B \times L$ -Produkt dividiert durch diesen Zeitraum berechnet;

(4) $t(L_v) - \bar{V}: r = -0,651; n = 19; p < 0,001$

je größer die durchschnittlichen Tumorstadiumsgeschwindigkeiten, desto früher treten Linksverschiebungen auf

(5) $t(\uparrow \text{PMN}) - \bar{V}: r = -0,195; n = 19; \text{nicht signifikant}$

je größer die durchschnittlichen Tumorstadiumsgeschwindigkeiten, desto früher die Zeiten des Anstiegs der Granulozyten

(6) partielle Korrelationen

$t(\bar{K}_{\text{Max}1}) - t(L_v): r = 0,618; n = 19; p < 0,001$

$t(\bar{K}_{\text{Max}1}) - t(\uparrow \text{PMN}): r = 0,488; n = 19; p < 0,05$

Die bisher aufgezeigten Beziehungen zwischen der Granulopoese und den Zeiten der erstmaligen Abnahme der Tumorstadiumsgeschwindigkeiten gelten auch für die Zeiten, von welchen an die Tumoren ihr Wachstum zum zweiten Mal verlangsamten ($t(\bar{K}_{\text{Max}2})$).

(1) $t(\bar{k}_{\text{Max } 2}) - t(\text{Lv})$: $r = 0,655$; $n = 16$; $p < 0,01$

(2) $t(\bar{k}_{\text{Max } 2}) - t(\text{PMN})$: $r = 0,526$; $n = 16$; $p < 0,05$

(3) $t(\bar{k}_{\text{Max } 2}) - \bar{v}$: $r = -0,577$; $n = 16$; $p = 0,01$

(4) partielle Korrelationen:

$t(\bar{k}_{\text{Max } 2}) - t(\text{Lv})$: $r = 0,451$; $n = 16$; $p < 0,05$

$t(\bar{k}_{\text{Max } 2}) - t(\text{PMN})$: $r = 0,516$; $n = 16$; $p < 0,05$

Weder für die Fluktuationen der T-Zellen, noch für die B-Zellen ergaben sich Beziehungen zum Tumorwachstum.

4.3.3. B x L - Produkte an den Tagen maximaler mittlerer Quoten $\bar{K}$ und durchschnittliche Tumorstadiumsgeschwindigkeiten

Zu den Zeiten, von welchen an die Tumoren erstmals langsamer wachsen, bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Tumorstadiumsgrößen (Tab. 3).

Tab. 3: Produkte an den Zeiten höchster mittlerer Wachstumsquoten ($t(\bar{K}_{\text{Max}})$) und durchschnittliche Tumorstadiumswachstumsgeschwindigkeiten ($\bar{V}$)

	$B \times L(t(\bar{K}_{\text{Max}} 1))$ (cm^2)	$B \times L(t(\bar{K}_{\text{Max}} 2))$ (cm^2)	$\bar{V}$ (cm^2/d)
V2:	1,93+1,02 (n=7)**	7,04+3,38 (n=7)	0,236+0,049 (n=7)
V3:	3,41+0,41 (n=7)*, **	5,91+0,42 (n=4)	0,399+0,053 (n=7)
V4:	2,07+0,46 (n=5)*	7,62+2,69 (n=5)	0,323+0,084 (n=5)
*	p < 0,01		**:
			p < 0,005

4.4. Chemilumineszenzaktivität (CA)

Die CA granulopoetischer Zellen des Milzaspirates verläuft biphasisch (Abb. 32 und 33).

Diese Veränderungen können weder durch Verschiebungen im Verhältnis segmentkerniger Granulozyten zugunsten weniger zur Chemilumineszenz beitragender unreifer granulopoetischer Zellformen, noch durch entsprechende Veränderungen der Konzentration lichtabsorbierender Erythrozyten erklärt werden (Abb. 34).

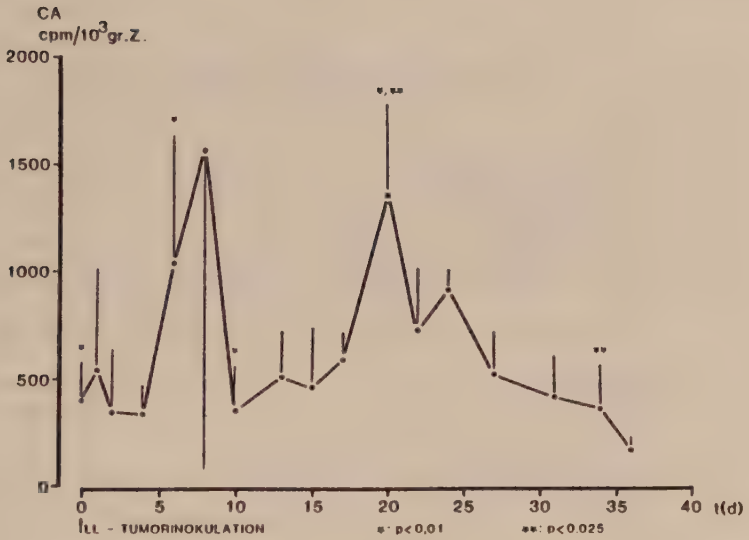


Abb. 32: Versuch 4 (n=5♀)

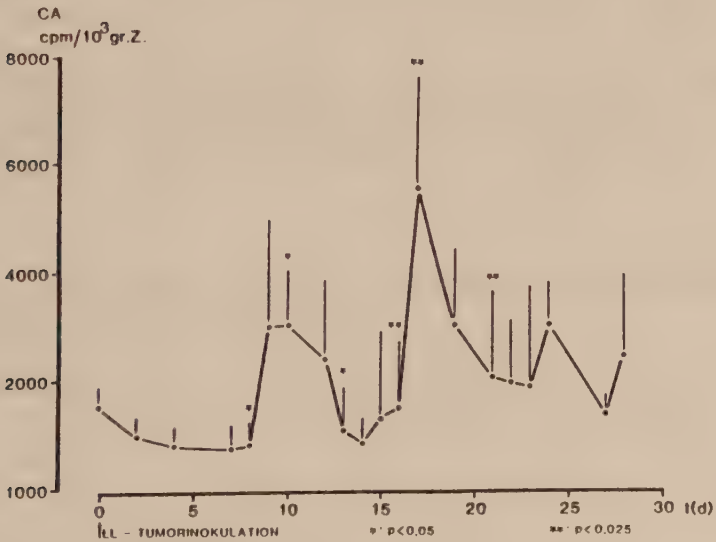


Abb. 33: Versuch 3 (n=4♀)

Abb. 32 und 33: CA granulopoetischer Zellen des Milzspirates tumortragender Mäuse

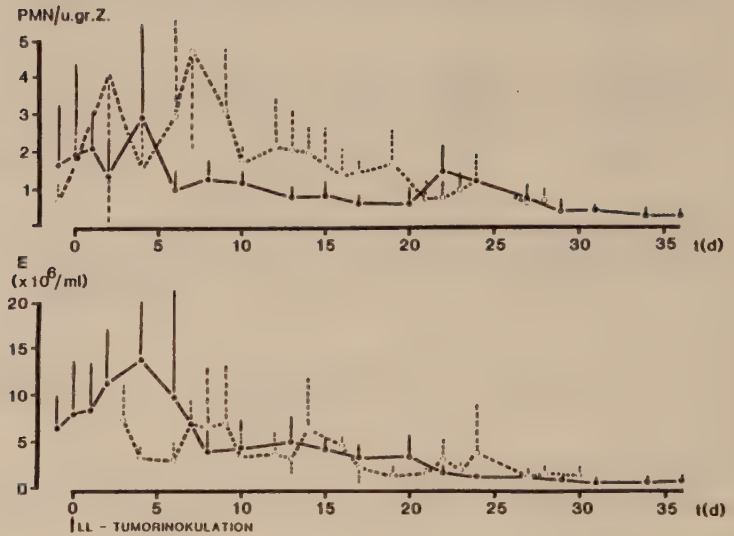


Abb. 34: Verhältnis segmentkerniger Granulozyten zu unreifen granulopoetischen Zellen (PMN/u.gr.Z.) und Erythrozytenkonzentration (E) im Chemilumineszenzmeßansatz, Versuch 4 (—•—) Versuch 3 (----)

4.4.1 Einfluß humoraler Faktoren auf die CA

Zellfreie Überstände, die durch Abzentrifugieren von Milzsuspensionen erhalten wurden, hemmen in jeder Phase des Tumorstadiums die CA gereinigter granulopoetischer Zellen. Mit steigender Verdünnung der Überstände wächst die CA der Zellen beträchtlich, maximal bis zum Zweifachen an (Tab. 4).

Tab. 4:

Peakchemilumineszenzaktivität (PCA) in Abhängigkeit des Überstandes zu HBSS - Lsg. Verdünnungsverhältnisses (VV) im Meßansatz. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben in Prozent den Volumenanteil des Milzgewebes in der Milzsuspension vor Abzentrifugieren des Überstandes an.

VV	PCA (Counts x min ⁻¹ x 10 ⁻³ Zellen)					
1:0	131(0,5%)	121(0,84%)	97(0,65%)	82(0,7%)	60(1,2%)	54(0,62%)
1:2	152	160	115	108	77	76
1:4	186	191	122	129	82	94
1:8	204	195	117	139	85	108
1:16	199	213	129	135	112	94
1:32	206	208	134	138	122	94
BxL ₂ (cm ²)	1,5	4,2	5,2	8,0	12,3	14,4

4.4.2 Beziehungen zwischen der CA granulopoetischer Zellen der Milz und dem LL-Tumorstadium

In Versuch 4 wurden eine maximale CA kurz vor - und in Versuch 3 zu den Zeiten abnehmenden Tumorstadiums gemessen (Tab. 5).

Tab. 5:

Zeiten abnehmender Tumorwachstumsgeschwindigkeiten ($t(\bar{k}_{\text{Max}})$)
 und Zeiten maximaler Chemilumineszenzaktivitäten ($t(CA_{\text{Max}})$)
 während des Tumorwachstums

	V3	V4
$t(CA_{\text{Max } 1})$ (d)	$10,8 \pm 1,5$ (n=4)	$6,4 \pm 1,0$ (n=5)
$t(\bar{k}_{\text{Max } 1})$ (d)	$9,1 \pm 1,9$ (n=5)	$8,8 \pm 1,0$ (n=5)
$t(CA_{\text{Max } 2})$ (d)	$17,0 \pm 0,0$ (n=4)	$19,0 \pm 2,2$ (n=5)
$t(\bar{k}_{\text{Max } 2})$ (d)	$15,2 \pm 2,3$ (n=5)	$22,0 \pm 4,4$ (n=5)

4.5 Ergebnisse zur Spezifität der Milzzellveränderungen in s.c.v. Milzen

4.5.1 Auswirkungen der Subkutanverlagerung auf die normale Milz

Das Gewicht der Milz nimmt nach ihrer subkutanen Verlagerung auf das 3fache des Normalen zu. Da die Zelldichte bis auf 1/3 abnimmt, bleibt die absolute Milzzellzahl unverändert. Die Lymphozytenzahl ändert sich nicht bzw. nimmt nur geringfügig zu. Erwähnenswert ist, daß die Erythrozytendichte in subkutan verlagerten Milzen signifikant erhöht ist (Tab. 6).

Tab. 6:

Vergleich intraabdominal gelegener (i.a.g.) Milzen und subkutan verlagelter (s.c.v.) Milzen

	i.a.g. Milzen		s.c.v. Milzen	
	♀	♂	V3 ♀	V4 ♀
Masse (g)	0,148±0,036 (n=5)	0,223±0,127 (n=5)	0,418±0,116 (n=7)	0,796±0,135 (n=10)
Zelldichte (x10 ⁶ /g)	832,0±470,0 (n=4)	737,5±192,2 (n=5)	413,0±105,0 (n=4)	235,1±131,9 (n=10)
Zellzahl/Milz (x10 ⁶)	124,9±54,7 (n=4)	182,6±74,5 (n=5)	194,2±67,8 (n=4)	190,2±118,8 (n=10)
Lymphozyten/ Milz (x10 ⁶)	108,4±48,6 (n=4)	105,1±35,0 (n=5)	151,4±24,1 (n=4)	121,6±76,7 (n=9)
Erythrozyten- dichte (x10 ⁶ /g)	3,0±0,9 * (n=9)	2,8±1,2 ** (n=9)		4,0±0,8 **, * (n=10)
Gewicht d.	30,9±1,8	38,6±5,4	31,2±2,9	30,1±2,2
Tiere (g)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=5)

*: p < 0,025

**: p < 0,005

4.5.2 Veränderungen in s.c.v. und intraabdominal gelegenen (i.a.g.) Milzen nach LL-Tumordinokulation

Der Vergleich von Abb. 35 mit den Abb. 17 und 18, sowie der Abb. 36 mit der Abb. 19 zeigt, daß nach LL-Tumordinokulation die Veränderungen des Gewichts, der Zelldichte und des Zellgehalts s.c.v. Milzen gegenüber den i.a.g. Organen zwar gleichsinnig, jedoch weniger ausgeprägt erfolgen. So steigen bei den i.a.g. Milzen das Gewicht doppelt, die Zelldichte dreimal und der Zellgehalt dreieinhalbmals so hoch gegenüber den Normalwerten an, wie bei den s.c.v. Milzen.

Für die absoluten Zahlen an Lymphozyten, an IgG + , an Thy 1.2 + und an Lyt 2.1 + Zellen ergeben sich zwischen den s.c.v. Milzen und den i.a.g. Milzen keine Unterschiede für die Art und für die Reihenfolge der nach Tumordinokulation einsetzenden Fluktuationen. Auffallend ist jedoch, daß die Veränderungen der Zellpopulationen in den i.a.g. Milzen nach der Tumordinokulation früher beginnen und wieder stärker ausgeprägt sind (Vgl.: Lymphozyten: Abb. 37 mit Abb. 20; IgG + Zellen: Abb. 38 mit Abb. 21; Thy 1.2 + Zellen: Abb. 39 mit Abb. 22; Lyt 2.1 + Zellen: Abb. 39 mit Abb. 23).

Ebenfalls schneller und intensiver spielen sich die Veränderungen der granulopoetischen Zellen in den i.a.g. Milzen nach Tumordinokulation ab (vgl. Abb. 40 mit Abb. 24 und 25).

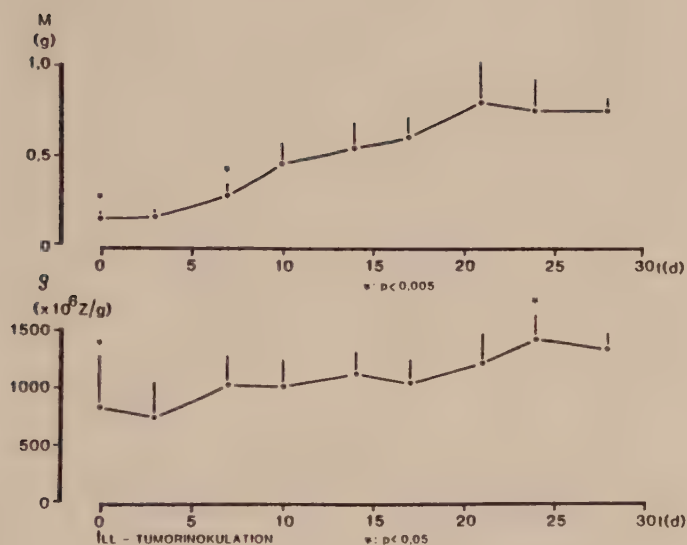


Abb. 35: (n=45 ♀)

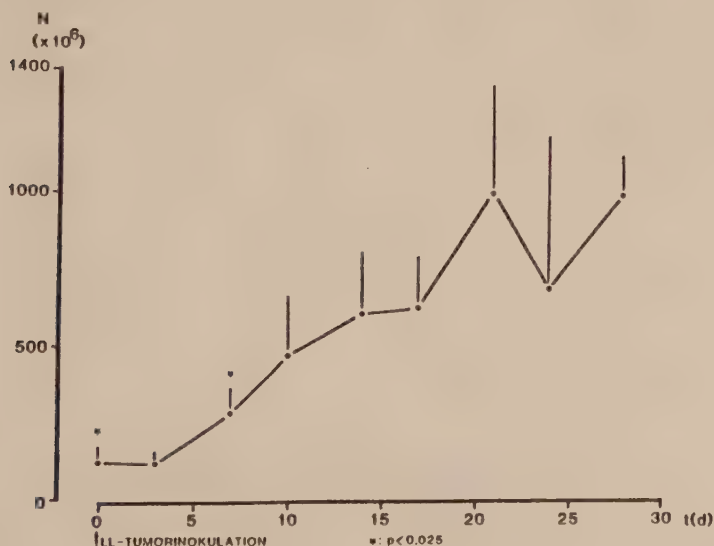


Abb. 36: (n=45 ♀)

Abb. 35 und 36: Masse (M), Zelldichte (g) und Zellzahl (N) in i.a.g. Milzen tumortragender Mäuse

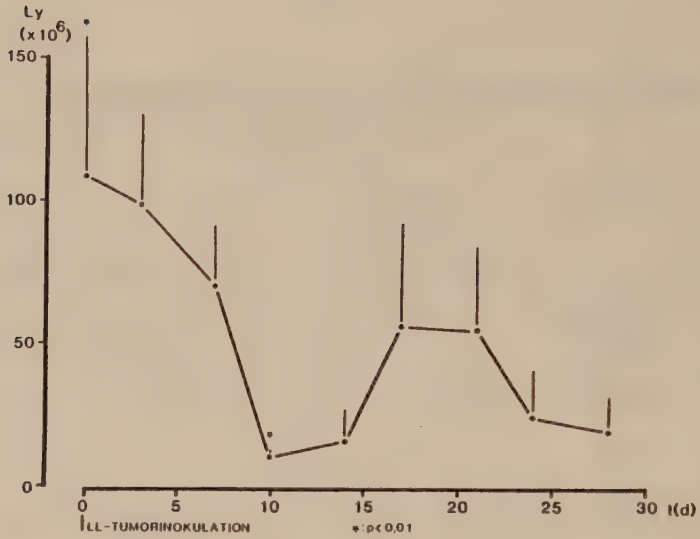


Abb. 37: (n=45 ♀)

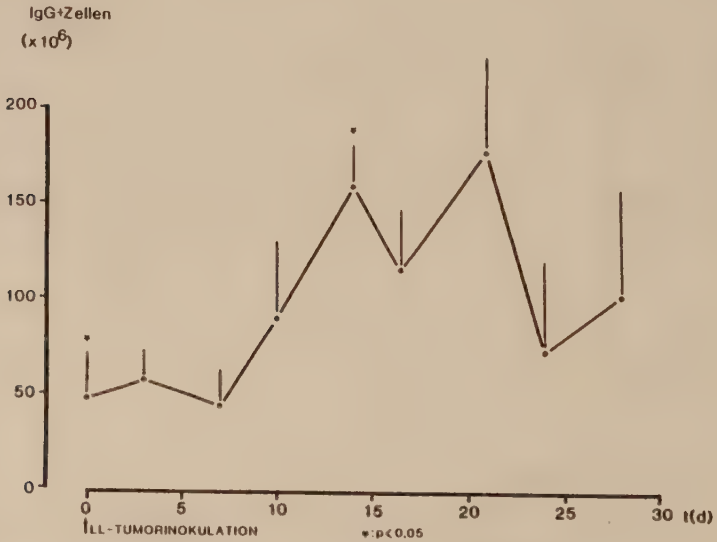


Abb. 38: (n=45 ♀)

Abb. 37 und 38: Lymphozyten (Ly) und Immunglobulin G (IgG)+ Zellen in i.a.g. Milzen tumortragender Mäuse

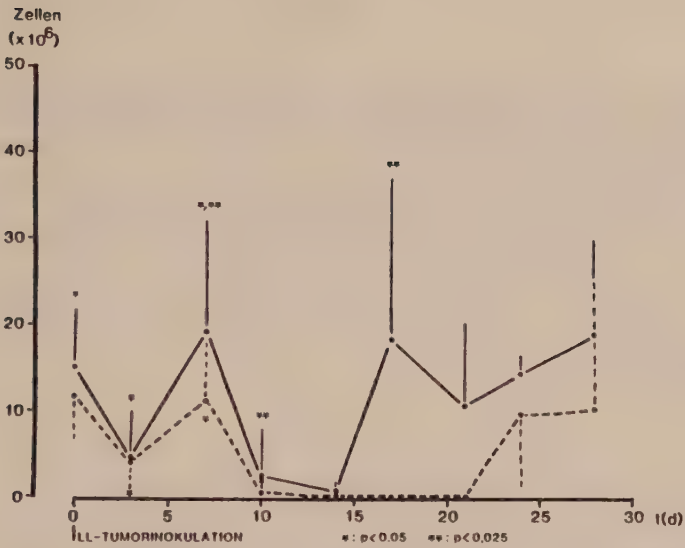


Abb. 39: Thy 1.2 + (·—) und Lyt 2.1 + (---) Zellen in i.a.g. Milzen tumortragender Mäuse (n=45♀)

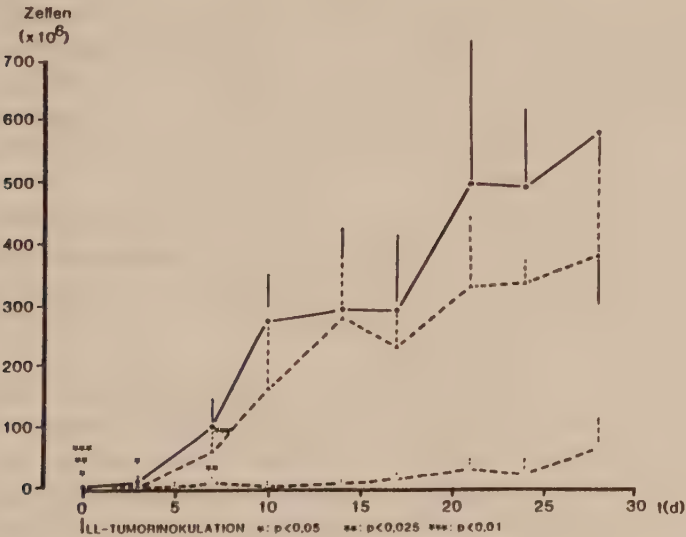


Abb. 40: Segmentkernige Granulozyten (—), granulo-poetische Zellen des Reifungs- (Δ---) und des Proliferationspools (Δ---) in i.a.g. Milzen tumortragender Mäuse (n=45♀)

4.5.3 Zellveränderungen in s.c.v. Milzen durch Inokulation von Tumorzellhomogenaten

Die Verabreichung von tiefgefrorenem Tumorphomogenat in einer zum Zellzerfall des natürlichen Tumorstums äquivalenten Dosierung führt zur Zunahme des Gewichtes, der Zelldichte und der Zellzahl in den s.c.v. Milzen. Diese Veränderungen sind in ihrer Art und Ausmaß mit denen beim LL-Tumorstum identisch (Tab. 7).

Deutliche Unterschiede bestehen jedoch für die Zellarten, die die Splenomegalie beim Tumorstum und während der Inokulation von Tumorphomogenaten hervorrufen. Im Gegensatz zum Tumorstum verändern sich die Lymphozytenzahlen in den Milzen durch die Applikation von Tumorphomogenaten nicht (vgl. Abb. 41 mit Tab. 12 Versuch 3 im Tabellenanhang).

Ebenfalls anders wie beim Tumorstum, verlaufen die Veränderungen der lymphozytären Subpopulationen. Bei Verabreichung der Tumorphomogenate nehmen sie gegenüber dem Tumorstum einen nahezu umgekehrten Verlauf ein. Während nach Tumordinokulation die IgG + Zellen unverändert bleiben, fallen sie nach Tumorphomogenatgabe (vgl. Abb. 42 mit Tab. 12 Versuch 3 im Tabellenanhang).

Die T-Zellpopulationen nehmen zunächst nach Tumordinokulation ab, steigen kurz an und sinken erneut ab, während nach Tumorphomogenatapplikation die T-Zellpopulationen zunächst unverändert bleiben und dann ansteigen (vgl. Abb. 43 mit Tab. 12 Versuch 3 im Tabellenanhang).

Auch die granulopoetischen Zellarten entwickeln sich bei der Verabreichung von Tumorphomogenaten wesentlich anders wie beim Tumorstum. So steigen die reifen Granulozyten bzw. die unreifen granulopoetischen Zellen des Reifungspools 14 bis 16 Tage nach Beginn der Tumorphomogenatgabe nur auf 1/11 bzw. 1/12 der für diese Zeiträume beim Tumorstum beobachteten Werte an. Erwähnenswert ist auch, daß unter den granulopoeti-

schen Zellen, deren Zunahme durch die Verabreichung von Tumorphomogenaten hervorgerufen wurde, von Anfang an eine Linksverschiebung, d.h. ein Überwiegen der unreifen über die reifen granulopoetischen Zellformen besteht. Beim Tumorstadium ereignet sich eine Linksverschiebung erst später (vgl. Abb. 45 mit Tab. 13 Versuch 3 im Tabellenanhang).

Die Zellen der Erythropoese zeigen während der Verabreichung von Tumorphomogenaten gegenüber dem Tumorstadium eine ausgeprägte Zunahme (vgl. Abb. 46 mit Tab. 13 Versuch 3 im Tabellenanhang).

Für die Entwicklung der Leukozyten im Blut ergeben sich, wie Tab. 8 zeigt, erhebliche Unterschiede zwischen den durch das Tumorstadium und den durch die Inokulation von Tumorphomogenaten hervorgerufenen Veränderungen (Tumorstadium: Granulozytose, später Lymphopenie, Tumorphomogenatinokulation: Lymphozytose)

Tab. 7:

Fluktuation (Fl) der Milzmasse (M), der Milzzelldichte (g) und der Milzzellzahl (N) im Inokulationsversuch (InV) und in Versuch 3

	Normalwerte	Fl	Signifikanz bei	Zwischenwerte
<u>M(g):</u>				
InV:	0,532+0,103 (n=10)	↗	Tag 12; (p<0,05)	0,869+0,319 (n=10) Tag: 14 bis 16
V3:	0,418+0,116 (n=7)	↗	Tag 4; (p<0,05)	1,054+0,277 (n=12) Tag: 14 bis 16
<u>g(x10⁶/g):</u>				
InV:	418,7+211,0 (n=9)	↘	n.s.	315,3+169,0 (n=9) Tag: 2 bis 4
		↗	n.s.	446,4+244,2 (n=8) Tag: 14 bis 16
V3:	413,0+105,0 (n=4)	↘	Tag 2; (p<0,05)	168,0+44,0 (n=4) Tag: 3
		↗	Tag 4; (p<0,025)	335,1+186,8 (n=12) Tag: 14 bis 16
<u>N(x10⁶):</u>				
InV:	217,8+100,3 (n=10)	↘	n.s.	194,0+125,4 (n=9) Tag: 2 bis 4
		↗	Tag 8; (p<0,05)	420,2+251,0 (n=8) Tag: 14 bis 16
V3:	194,2+67,8 (n=4)	↘	Tag 2; (p<0,025)	77,7+37,5 (n=4) Tag 2
		↗	Tag 4; (p<0,05)	371,1+266,4 (n=12) Tag: 14 bis 16

↗: Anstieg ↘: Abfall

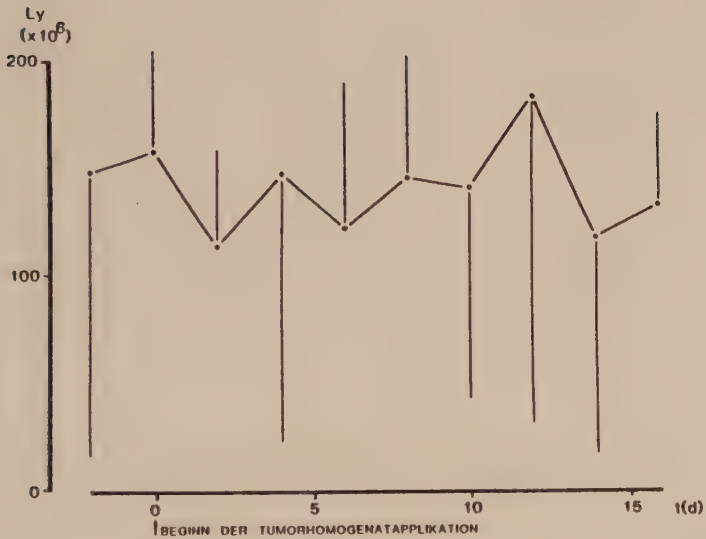


Abb. 41: (n=5 ♀)

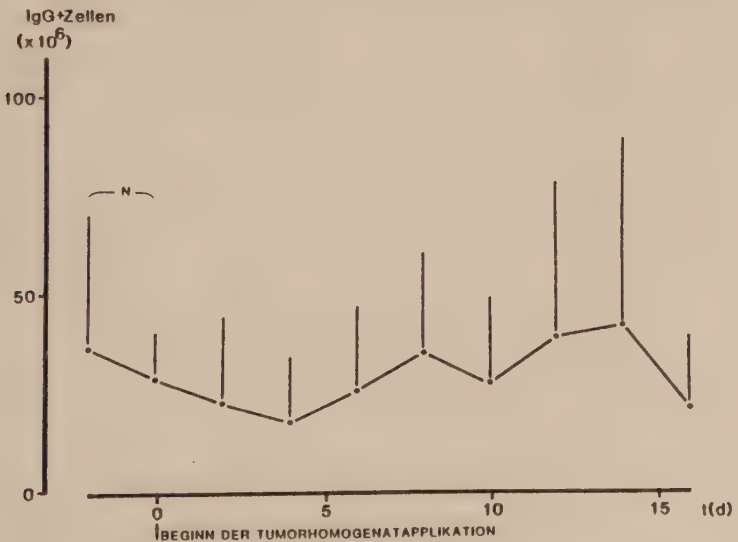


Abb. 42: (n=5 ♀)

Abb. 41 und 42: Lymphozyten (Ly) und Immunglobulin G (IgG) + Zellen in s.c.v. Milzen während Tumorphomogenatinokulation

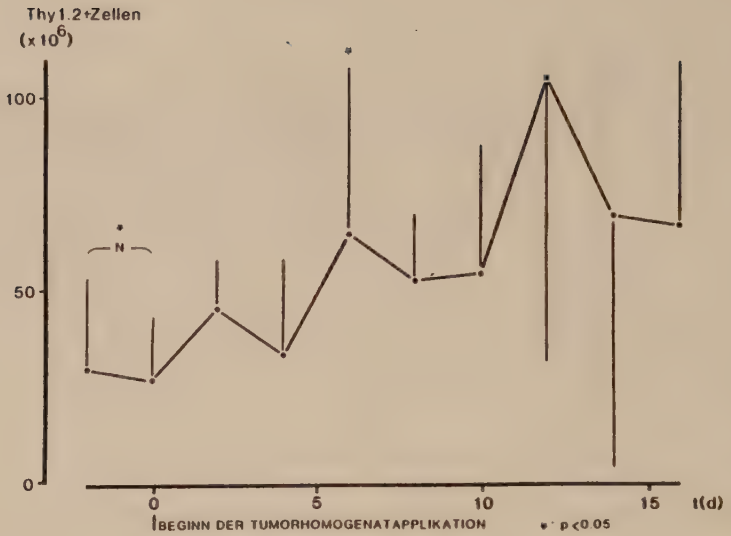


Abb. 43: (n=5 ♀)

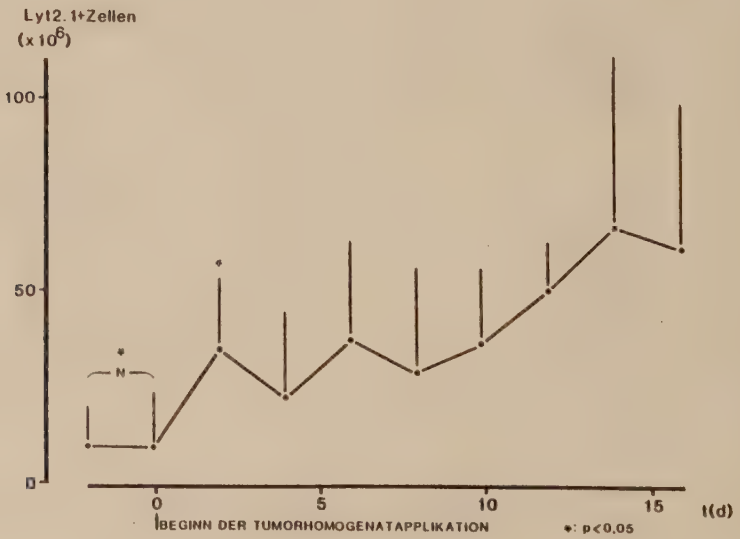


Abb. 44: (n=5 ♀)

Abb. 43 und 44: Thy 1.2 und Lyt 2.1 + Zellen in s.c.v. Milzen während Tumorphomogenatinokulation

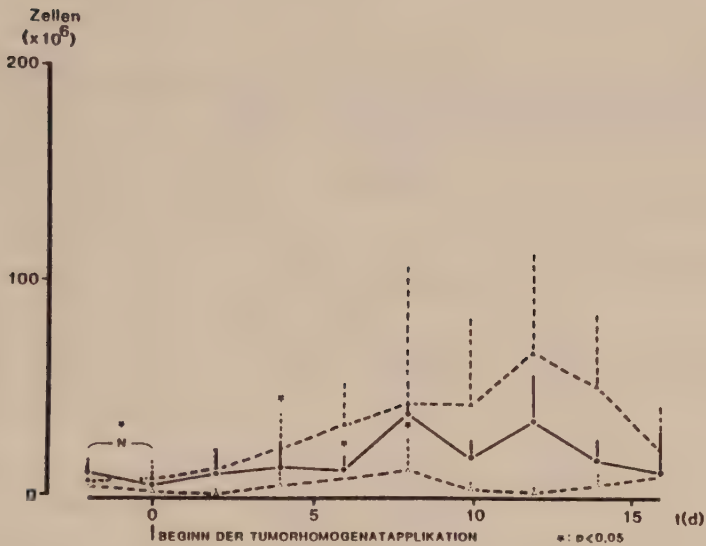


Abb. 45: Segmentierte Granulozyten (·—·), granulopoetische Zellen des Reifungs- (▲---) und des Proliferationspools (Δ---) in s.c.v. Milzen während Tumorphomogenatinokulation (n=5♀)

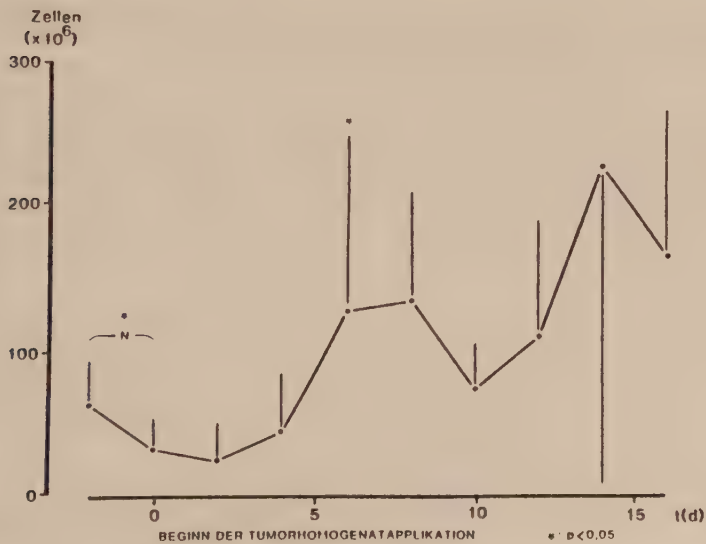


Abb. 46: Erythropoetische Zellen in s.c.v. Milzen während Tumorphomogenatinokulation (n=5♀)

Tab. 8:

Fluktuation der Blutleukozyten im Inokulationsversuch (InV)
und im Versuch (V) 3

		Normalwerte	Tag 14 bis 16
Lymphozyten	InV	5012±1215 (n=9)	7926±2970 (n=8)
	V3	8717±2181 (n=4)	8903±4729 (n=4)
PMN	InV	655±345 (n=9)	1631±908 (n=8)
	V3	235±214 (n=4)	63172±37965 (n=4)
u.gr.Z.d.Rp.	InV	196±80 (n=9)	298±366 (n=4)
	V3	48±57 (n=4)	8747±4489 (n=8)
Monozyten	InV	24±72 (n=9)	495±514 (n=8)
	V3	0±0 (n=4)	0±0 (n=4)

4.6 Überlebenszeiten zu verschiedenen Tumorstadien splenektomierter und scheinoperierter Tiere

Versuchstiere, deren Milz noch am gleichen Tag bzw. bis zu drei Tage nach der Tumorinokulation entfernt wird, leben signifikant länger. Es schließen sich danach zwei Phasen an, in welchen die Splenektomie für die Überlebenszeiten der Tiere zunächst von Nachteil und später gegen Ende des Tumorwachstums wieder von Vorteil ist (Abb. 47).

Auch bei weiblichen Tieren bewirkt die zu Beginn des Tumorwachstums ausgeführte Splenektomie eine, wenn auch nicht signifikante, aber doch erkennbare Lebensverlängerung. Danach wirkt sich die Splenektomie auf die Überlebenszeiten der Tiere völlig unregelmäßig aus (Abb. 48).

Beim Vergleich von Abb. 49 mit der Abb. 47 (vgl. a. Abb. 48 mit Abb. 37) fällt auf, daß der zu Beginn des Tumorwachstums

vorhandene günstige Effekt der Splenektomie nur solange besteht, wie die Milzen einen hohen Gehalt an Lymphozyten aufweisen. Mit Reduktion des lymphatischen Gewebes nimmt die lebensverlängernde Wirkung der Splenektomie ab. Dies spricht für die immunologische Natur der Tumorprotektion durch die Milz.

Welche Rolle die T- und B-Zellen hierbei spielen ist aus der nächsten Abbildung 50 ersichtlich.

Danach leben splenektomierte Tiere um so länger, je höher das Verhältnis der IgG + Zellen zu den Thy 1.2 + Zellen in den entfernten Milzen ist.

Diese Beziehung beinhaltet zwei Aussagen:

1. Je mehr IgG + Zellen als Thy 1.2 + Zellen durch Splenektomie entfernt werden, desto länger leben die Tiere.
2. Je mehr Thy 1.2 + Zellen als IgG + Zellen durch Splenektomie entfernt werden, desto kürzer leben die Tiere.

Entsprechend Aussage 1 wurde bei den männlichen und weiblichen Tieren eine positive Korrelation zwischen den absoluten Zahlen entfernter B-Zellen und den Überlebenszeiten und entsprechend Aussage 2 eine negative Korrelation zwischen den absoluten Zahlen entfernter T-Zellen und den Überlebenszeiten gefunden. Beide Korrelationen waren jedoch statistisch nicht zu sichern.

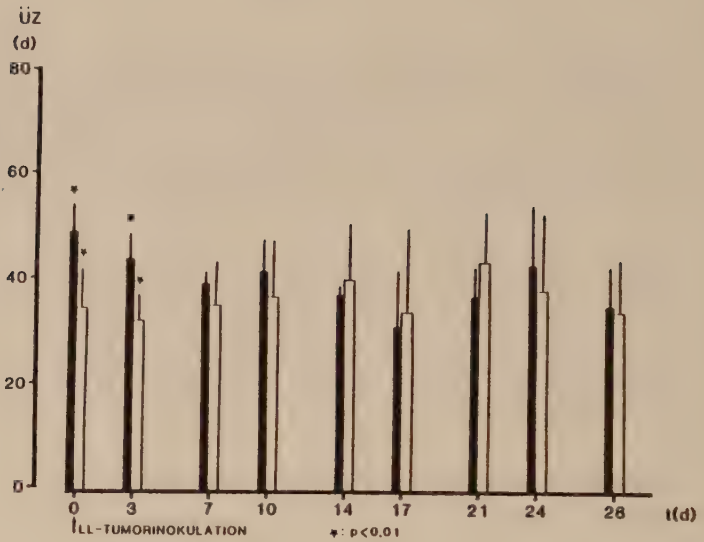


Abb. 47: (n=90♂)

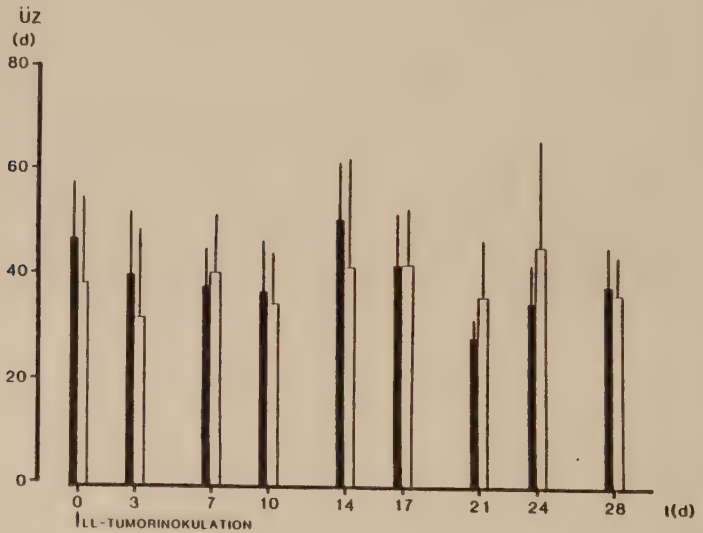


Abb. 48: (n=90♀)

Abb. 47 und 48: Überlebenszeit (ÜZ) zu verschiedenen Zeiten nach LL-Tumoringokulation splenektomierter (■) und scheinoperierter (□) Tiere

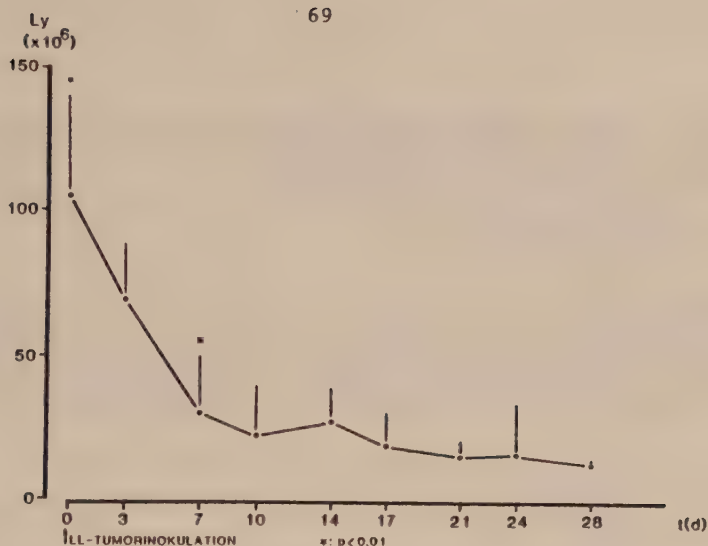


Abb. 49: Lymphozyten (Ly) zu verschiedenen Zeiten nach LL-Tumoringokulation entfernter Milzen (n=45♂)

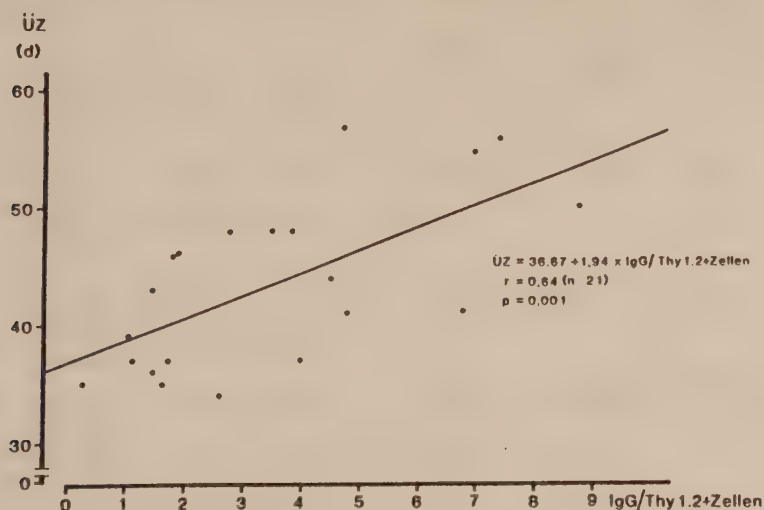


Abb. 50: Beziehung zwischen der Überlebenszeit (ÜZ) splenektomierter Tiere und dem Verhältnis IgG + zu Thy1.2 + Zellen in den entfernten Milzen (n = 21 ♂, ♀); die in die Berechnung der Korrelation eingehenden Werte-paare wurden an Milzen bestimmt, die 0,3 und 7 Tage nach Tumoringokulation entfernt wurden

4.7. Tabellenanhang: Zellveränderungen in der Milz und im Blut vor und nach LL-Tumorinokulation

4.7.1. In Prozent

Tab. 9:

Fluktuation (Fl) des prozentualen Anteils von Lymphozyten (Ly), segmentkernigen Granulozyten (PMN), unreifen granulopoetischen Zellen des Reifungspools (u.gr.Z.Rp.), des Proliferationspools (u.gr.Z.d.Pp.) und von erythropoetischen Zellen (erythro. Z.) in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse.

	N	Fl	Signifikanz bei	Max, E
<u>Ly:</u>				
V2: (8♀)	85,8±9,1% (n=48) Tag: -10 bis 0	↘	Tag 8; (p<0,005)	10,9±6,5% (n=78) Tag: 23 bis 57
V3: (5♀)	88,7±6,5% (n=15) Tag: -1 bis 0	↘	Tag 2; (p<0,025)	13,5±10,3% (n=78) Tag: 12 bis 30
V4: (5♀)	66,0±8,9% (n=9) Tag: -1 bis 0	↘	Tag 6; (p<0,05)	18,9±9,8% (n=35) Tag: 15 bis 36
<u>PMN:</u>				
V2:	5,2±3,0% (n=48)	↗ ↘	Tag 8; (p<0,005) Tag 27; (p<0,01)	66,4±10,8% (n=7) Tag: 23 25,0±4,2% (n=3) Tag: 57
V3:	1,6% (n=15)	↗ ↘	Tag 1; (p<0,01) Tag 21; (p<0,005)	46,5±13,3% (n=6) Tag: 15 21,0±5,6% (n=3) Tag: 30
V4:	6,3±3,9% (n=9)	↗ ↘	Tag 6; (p<0,01) Tag 31; (p<0,025)	34,0±6,7% (n=4) Tag: 22 15,3±6,5% (n=3) Tag: 36
<u>u.gr.Z.d.Rp.:</u>				
V2:	2,9±3,7% (n=48)	↗	Tag 10; (p<0,05)	45,5±9,2% (n=3) Tag: 57
V3:	2,3±2,2% (n=15)	↗	Tag 2; (n.s.)	38,0±4,6% (n=3) Tag: 30
V4:	4,1±3,6% (n=9)	↗	Tag 6; (p<0,001)	49,0±2,6% (n=3) Tag: 36

	N		F1	Signifikanz bei	Max, Min, E
<u>u.gr.Z.d.Pp.:</u>					
V2:	0,1%±0,2% (n=48)	↑	Tag 10; (p<0,05)	5,5%±3,5% (n=2)	Tag: 57
V3:	0,5%±0,8% (n=15)	↑	Tag 8; (p<0,01)	18,3%±7,1% (n=3)	Tag: 30
V4:	1,6%±1,1% (n=15)	↑	Tag 15; (n.s.)	7,3%±1,2% (n=3)	Tag: 36
<u>erythro.Z.:</u>					
V2:	4,1%±5,5% (n=48)	↑	Tag 3; (p<0,01)	9,6%±6,3% (n=9)	Tag: 3
		↓	Tag 10; (p<0,05)	1,7%±1,8% (n=7)	Tag: 23
		↑	Tag 34; (p<0,05)	8,9%±8,6% (n=56)	Tag: 34 bis 57
V3:	4,1%±1,8% (n=15)	↑	Tag 7; (p<0,01)	11,6%±7,8% (n=8)	Tag: 8
		↓	Tag 12; (p<0,05)	3,7%±3,9% (n=6)	Tag: 15
		↑	Tag 24; (n.s.)	7,1%±3,5% (n=16)	Tag: 24 bis 30
V4:	21,7%±9,1% (n=9)	↑	Tag 1; (n.s.)	30,4%±13,4% (n=5)	Tag: 1
		↓	Tag 6; (p<0,05)	15,2%±8,1% (n=5)	Tag: 15
		↑	Tag 29; (n.s.)	19,9%±9,9% (n=13)	
↑ : Anstieg ↓ : Abfall n.s.: nicht signifikant					

Tab. 10:

Fluktuation (Fl) des prozentualen Anteils von Lymphozyten (Ly), segmentkernigen Granulozyten (PMN) und unreifen granulopoetischen Zellen des Reifungspools (u.gr.Z.d.Rp.) im Blut tumortragender Mäuse

	N	Fl	Signifikanz bei	Max, Min, Pl, E
<u>Ly:</u>				
V2:	83,7%±8,2% (n=31)	↓	Tag 8; (p<0,005)	6,4%±3,5% (n=59) Tag: 25 bis 57
V3:	93,9%±4,6% (n=16)	↓	Tag 2; (p<0,01)	7,5%±4,5% (n=22) Tag: 21 bis 28
V4:	79,3%±7,2% (n=4)	↓	(1)	7,6%±4,1% (n=7) Tag: 27 bis 34
<u>PMN:</u>				
V2:	12,1%±7,2% (n=31)	↑	Tag 8, (p<0,005)	65,8%±17,4% (n=24) Tag: 14 bis 21
		↑	Tag 21; (n.s.)	71,4%±9,5% (n=60) Tag: 25 bis 57
V3:	3,1%±2,75 (n=18)	↑	Tag 1; (p<0,05)	66,8%±14,5% (n=21) Tag: 13 bis 19
		↑	Tag 21; (n.s.)	75,5%±9,2% (n=22) Tag: 21 bis 28
V4:	16,3%±6,6% (n=4)	↑	(1)	68,2%±6,4% (n=7) Tag: 27 bis 34
<u>u.gr.Z.d.Rp.:</u>				
V2:	3,6%±2,7% (n=31)	↑	Tag 10; (p<0,01)	11,2%±7,6% (n=6)
		↓	Tag 17; (n.s.)	7,8%±4,9% (n=8)
		↑	Tag 21; (p<0,025)	21,7%±9,8% (n=59)
V3:	0,8%±0,8% (n=16)	↑	Tag 8; (p<0,025)	11,4%±5,9% (n=7)
		↓	Tag 13; (n.s.)	8,1%±2,4% (n=7)
		↑	Tag 19; (p<0,01)	16,7%±8,4% (n=29)
V4:	4,5%±1,7% (n=4)	↑	(1)	23,9%±6,4% (n=7)

(1): Angabe nicht sinnvoll, da zu große Zeitabstände zwischen den einzelnen Blutbildern

4.7.2. Absolut

Tab. 11:

Fluktuation (F1) der Masse (M), der Zelldichte (g), und der Milzzellzahl (N) in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse

	N	F1	Signifikanz bei	Max, Min, E
<u>M: (g)</u>				
V3:	0,418g $\pm$ 0,116g (n=7)	↗	Tag 4; (p<0,05)	1,146 $\pm$ 0,210 (n=4) Tag: 19
		↘	Tag 28; (n.s.)	0,681 $\pm$ 0,067 (n=3) Tag: 30
<u>g: (x10⁶/g)</u>				
V3:	413,0 $\pm$ 105,0 (n=4)	↗	Tag 2; (p<0,05)	168,0 $\pm$ 44,0 (n=4) Tag: 3
		↘	Tag 4; (p<0,025)	355,7 $\pm$ 181,4 (n=72) Tag: 7 bis 32
<u>N: (x10⁶)</u>				
V3:	194,2 $\pm$ 67,8 (n=4)	↘	Tag 2; (p<0,025)	77,7 $\pm$ 37,6 (n=4) Tag: 2
		↗	Tag 4; (p<0,05)	653,4 $\pm$ 411,5 (n=4) Tag: 19
		↘	Tag 22; (n.s.)	214,8 $\pm$ 58,9 (n=3) Tag: 30

Tab. 12:

Fluktuation (F1) der Lymphozyten (Ly), der IgG + und der Thy 1.2 + Zellen in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse (x10⁶)

	N	F1	Signifikanz bei	Max, Min, E
<u>Ly:</u>				
V3:	151,4 $\pm$ 24,1 (n=4)	↘	Tag 2; (p<0,025)	59,5 $\pm$ 30,2 (n=4) Tag: 2
		↗	Tag 4; (p<0,025)	159,0 $\pm$ 121,0 (n=2) Tag: 6
		↘	Tag 13; (p<0,05)	9,2 $\pm$ 0,1 (n=4) Tag: 13
		↗	Tag 16; (p<0,05)	85,8 $\pm$ 59,0 (n=4) Tag: 19
		↘	Tag 24; (p<0,05)	18,8 $\pm$ 12,4 (n=10)
<u>IgG+Z.:</u>				
V3:	52,5 $\pm$ 9,3 (n=4)	↗	Tag 10; (n.s.)	81,3 $\pm$ 99,6 (n=4) Tag: 14
		↘	Tag 15; (n.s.)	67,2 $\pm$ 44,9 (n=4) Tag: 21

Thyl.2+Z:

V3:	41,9±10,1	(n=4)	↘	Tag 2; (p<0,05)	14,4±16,8 (n=9)
					Tag: 2 bis 6
			↑	Tag 7; (n.s.)	56,7±49,3 (n=4)
					Tag: 8
			↘	Tag 10; (n.s.)	0,7±1,4 (n=4)
					Tag: 15
			↑	Tag 23; (p<0,025)	14,8±19,2 (n=19)
					Tag: 23 bis 30

Tab. 13:

Fluktuation der segmentkernigen Granulozyten (PMN), der granulopoetischen Zellen des Reifungspools (u.gr.Z.d.Rp.), des Proliferationspools (u.gr.Z.d.Pp.) und der erythropoetischen Zellen (erythro.Z.) in s.c.v. Milzen tumortragender Mäuse ($\times 10^6$)

	N		Fl	Signifikanz bei	Max, Min, Pl, E
<u>PMN:</u>					
V3:	4,0±3,6	(n=4)	↑	Tag 4; (p<0,05)	281,3±152,7 (n=4)
					Tag: 19
			↘	Tag 21; (p<0,05)	113,5±102,5 (n=10)
					Tag: 27 bis 30
<u>u.gr.Z.d.Rp.:</u>					
V3:	4,1±4,6	(n=6)	↑	Tag 6; (p<0,005)	93,3±82,6 (n=27)
					Tag: 10 bis 17
			↑	Tag 19; (p<0,05)	133,8±85,7 (n=29)
					Tag: 19 bis 30
<u>u.gr.Z.d.Pp.:</u>					
V3:	0,0	(n=4)	↑	Tag 10; (p<0,05)	45,1±28,5 (n=2)
					Tag: 30
<u>erythro.Z.:</u>					
V3:	6,6±2,9	(n=4)	↑	Tag 4; (n.s.)	46,8±65,3 (n=4)
			↘	Tag 15; (n.s.)	7,7±5,6 (n=4)
					Tag: 15
			↑	Tag 16; (p<0,05)	22,7±22,1 (n=37)

Tab. 14:

Fluktuation (Fl) der Konzentration an Lymphozyten (Ly), an segmentkernigen Granulozyten (PMN) und an unreifen granulopoetischen Zellen des Reifungspools (u.gr.Z.d.Rp.) im Blut tumortragender Mäuse ($\times 10^3/\mu\text{l}$)

	N	Fl	Signifikanz bei	Endwert (E)
<u>Ly:</u>				
V4:	8119 $\pm$ 6634 (n=4)	$\uparrow$	Tag 13; (n.s.)	14202 $\pm$ 7534 (n=3)
		$\downarrow$	Tag 34; (p<0,05)	Tag: 20 7366 $\pm$ 2241 (n=3) Tag: 34
<u>PMN:</u>				
V4:	1375 $\pm$ 739 (n=4)	$\uparrow$	Tag 4; (p<0,01)	121246 $\pm$ 44890 (n=3) Tag: 34
<u>u.gr.Z.d.Rp.:</u>				
V4:	356 $\pm$ 111 (n=4)	$\uparrow$	Tag 8; (p<0,01)	44070 $\pm$ 22427 (n=3) Tag: 34

5. Diskussion

5.1 Versuchsergebnisse zur ersten Teilfrage

5.1.1 Normale Prozent- und Absolutwerte licht- und immunfluoreszenzmikroskopisch differenzierter Milzzellen

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt die qualitativen und quantitativen Zellveränderungen in s.c.v. Milzen während des LL-Tumorstadiums. Die Beurteilung der qualitativen Veränderungen erfolgte an Hand von Splenogrammen. Dabei wurden die Zellen des Makrophagen-Systems nicht berücksichtigt. Zwei Gründe sind hierfür anzuführen:

Zum einen kommen in der normalen Milz Monozyten nur mit ca. 1-3% vor. Zum anderen steigt in den Versuchen der Prozentsatz an Monozyten-Makrophagen in der Milz auch nach LL-Tumorstadiuminokulation nicht an. Die während des Tumorstadiums massiv einsetzende Granulopoese verdrängt neben den Lymphozyten zusätzlich die Makrophagen, so daß ihre Prozentzahlen auf vernachlässigbare Werte absinken. Da Monopoese und Granulopoese eine gemeinsame determinierte Stammzelle haben, ist die Differenzierung von granulopoetischen Zellen und Monozyten schwierig. Um Verwechslungen der unreifen Zellen auszuschließen, wurden Milzzellen Mäusen zu verschiedenen Zeiten während des Tumorstadiums entnommen und fermentzytochemisch auf den Gehalt an Peroxidase und unspezifische Esterase untersucht. Stets fand sich Übereinstimmung zwischen den nach den morphologischen Kriterien identifizierten granulopoetischen Zellformen und der für diese Zellformen zu erwartenden Reaktivität in der Peroxidasefärbung.

Die Beobachtung, daß Monozyten zahlenmäßig in der Milz während des LL-Tumorstadiums von untergeordneter Bedeutung sind, wird durch die Arbeit von Otu (125) unterstützt. Er fand, daß Seren aus LL-Tumoren tragenden Mäusen und Überstände von kultivierten LL-Tumorzellen Faktoren enthalten, die die Makrophagenkoloniebildung von Knochenmarkszellen

hemmen.

Prostaglandine, insbesondere solche der E-Serie, sind ein häufiges Stoffwechselprodukt von malignen Zellen. Auch das LL-Sarkom bildet *in vitro*, wie *in vivo* Prostaglandin E₂ (197). Nach Einwirkung von Prostaglandin E₁ auf Knochenmarklangzeitkulturen, die unter einem die Stammzellenproliferation förderndem Einfluß durch Kolonien stimulierende Faktoren (CSF) standen, zeigte sich eine prozentuale Zunahme, sowie eine Rechtsverschiebung unter den granulopoetischen Zellen und eine prozentuale Abnahme der Monozyten-Makrophagen im Kulturmedium (120).

Weiterhin wäre denkbar, daß der LL-Tumor CSF bildet, die bevorzugt die Proliferation granulopoetisch determinierter Kolonien bildender Zelleinheiten (G-CFU) fördern. Für den NFSa Tumor, ein spontan in C3H/Bu Mäusen entstandenes Fibrosarkom konnte beispielsweise nachgewiesen werden, daß der Tumor zwei voneinander isolierbare CSF-Arten (G-CSF u. M-CSF) bildet, die bevorzugt granulopoetisch determinierte Kolonien (G-CFU_C) oder monopoetisch determinierte Kolonien (M-CSU_C) stimulieren (149).

Vergleicht man das normale Splenogramm der in den Versuchen verwendeten NRMI-Maus mit den in der Literatur beschriebenen Splenogrammen verschiedener anderer Mausstämmen (16, 33, 103, 133, 136), so ergibt sich eine gute Übereinstimmung.

Weniger gut stimmen die bei der normalen NRMI-Maus gefundenen Prozentwerte an immunfluoreszenzmikroskopisch (i.f.m.) differenzierten Milzzellarten mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein (16, 24, 65, 99, 103, 124, 132, 133, 172). Dies trifft vor allem für die T-Zellen zu. Selbst bei Untersuchung des gleichen Mausstammes mit der gleichen Technik ergeben sich von Untersucher zu Untersucher größere Abweichungen für die prozentualen Anteile an Thy 1.2. + Zellen. Sieht man hiervon ab, dann besteht die Gemeinsamkeit der

Ergebnisse darin, daß mehrheitlich die B-Zellen die T-Zellen in der normalen Mäusemilz prozentual überwiegen.

In Tabelle 16 wurden die absoluten Zahlen morphologisch und immunfluoreszenzmikroskopisch (i.f.m.) differenzierbarer Milzzellarten für die verschiedenen in der Literatur beschriebenen Mausstämmen den eigenen Normalwerten gegenübergestellt.

Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, variieren die Milzgewichte für die verschiedenen Mausstämmen erheblich. Besonders auffällig ist die Differenz zwischen den Massen der s.c.v. und den i.a.g. Milzen der in den Versuchen verwendeten NRMI-Mäuse. Bei s.c.v. Milzen könnte es im Bereich der durch eine Tabaksbeutelnaht verschlossenen Bauchwand zur Kompression der Milzgefäße kommen, die zu einer stauungsbedingten Splenomegalie führt. Gut in Übereinstimmung mit dieser Erklärung steht der Befund signifikant ($p < 0,005$) erhöhter Erythrozytendichten in den s.c.v. Milzen (s. Tab. 6). Obwohl die Milzgewichte zwischen den einzelnen Mausstämmen große Unterschiede zeigen, ergeben sich aufgrund der inversen Beziehung zwischen dem Milzgewicht und der Milzzelldichte, insbesondere der Lymphozytendichte, relativ einheitlich hohe Lymphozytenzahlen pro Milz. Dies gilt nicht nur für die beiden Gruppen der s.c.v. und der i.a.g. Milzen der NRMI-Mäuse, sondern auch für die Milzen der übrigen Mausstämmen. Entsprechend den oben aufgezeigten Unterschieden der prozentualen Anteile an B- und T-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Mausstämmen, variiert die Zahl der T-Zellen stärker als die Zahl der B-Zellen in den Milzen unterschiedlicher Mausstämmen.

Tab. 16:

Absolute Zahlen morphologisch und immunfluoreszenzmikroskopisch differenzierbarer Milzzellarten in normalen Mäusen verschiedener Mausstämmen

	S.C.V.		NRMI		1.a.g.		Balb/c	CE	Balb/c x CE	C3H/HeJ	C57BL/6N	CBA/H-T6
	m(g)	g(x10 ⁶ /g)	413 ± 105	832 ± 470	0.116	0.148 ± 0.036	0.087 ± 0.002	0.070 ± 0.003	0.08 ± 0.001	0.170	0.073	
N(x10 ⁶ /g)	185.3 ± 100.1	124.9 ± 54.7	84.0 ± 26.0	105.5 ± 23.1	139.0 ± 27.4	194.0 ± 41.0	76					
Ly	130.8 ± 65.4	108.4 ± 48.6	78.1 ± 24.1	77.1 ± 5.9	68.1 ± 6.9	126.3 ± 7.2	60					
PMN	7.5 ± 4.5	2.4 ± 2.1	3.6 ± 1.1	9.0 ± 2.0	9.3 ± 3.2							
gr.Z.d.Rp.	9.8 ± 17.6	0.9 ± 0.8										
gr.Z.d.Pp.	3.1 ± 4.3	0.4 ± 0.7										
erythro.Z.	1.2 ± 33.7	13.6 ± 15.9										
IGM + Z.			27.0 ± 7.8	8.8 ± 5.3	6.9 ± 1.2							
IGG + Z.	47.8 ± 22.4	47.0 ± 24.0										
Thy1.2 + Z.	44.4 ± 20.9	15.0 ± 6.7	33.7 ± 5.9	48.8 ± 7.0	36.7 ± 1.2							
			(16)	26.3 ± 6.5	14.3 ± 4.7	25.2 ± 2.2	25	(87)	(65)			
				(103)	(103)							

m : Milzmasse g ; Milzellidichte N : Milzellzahl Ly : Lymphozyten

PMN : polymorphkernige neutrophile Granulozyten

gr.Z.d.Rp. : granulopoetische Zellen des Reifungspools

gr.Z.d.Pp. : granulopoetische Zellen des Proliferationspools

erythro.Z. : erythropoetische Zellen

IGM + Z. : Immunglobulin M positive Zellen

IGG + Z. : Immunglobulin G positive Zellen

Thy1.2 + Z. : Thy1.2 positive Zellen

- 1) Die für die normale Milz der NRMI-Maus gefundenen prozentualen und absoluten Werte an morphologisch und i.f.m.-differenzierten Milzzellarten entsprechen den Angaben für andere Mausstämmen in der Literatur (16, 24, 33, 65, 87, 99, 103, 124, 132, 133, 136, 150, 172).

5.1.2. Absolute Veränderungen der Lymphozytenpopulationen in der Milz

Innerhalb von zwei Tagen nach der LL-Tumordinokulation verändert sich die Lymphozytenzahl in der Milz um bis zu 100 Millionen Zellen (Abb. 20, Tab. 12).

Es erscheint interessant zu überprüfen, ob die beobachteten Fluktuationen der Milzlymphozyten in diesem Ausmaß überhaupt möglich sind.

Aus den Untersuchungen von Ford (59, 60) geht hervor, daß in der Ratte der Pool an rezirkulierenden Lymphozyten sich mit 70 % auf die Lymphknoten, mit 25 % auf die Milz und mit 5 % auf das Blut aufteilt. Die Transitzeiten der rezirkulierenden Lymphozyten durch diese Kompartimente betragen für die Lymphknoten 15 h, für die Milz 5 h und für das Blut weniger als 1 h. Geht man von einem Blutvolumen von 55 ml/kg Körpergewicht (152) und einem mittleren Gewicht von 30 g der weiblichen NRMI-Maus aus (Tab. 6), dann ergeben sich bei einer durchschnittlichen Blutlymphozytenkonzentration von 8400 Zellen/ μ l für die Gesamtzahl aller Lymphozyten im Blut ca. $13,9 \times 10^6$ Zellen. Überträgt man Fords Schema rezirkulierender Lymphozyten auf die NRMI-Maus, dann enthält die Mäusemilz ca. $69,3 \times$

-
- 1) : Die fettgedruckten Abschnitte stellen kurze Zusammenfassungen dar. Unmittelbar aufeinanderfolgend gelesen ermöglichen sie einen schnellen Überblick über die einzelnen Kapitel.

10^6 rezirkulierender Zellen, die das Organ innerhalb von 5 h verlassen. Bei einem durchschnittlichen Lymphozytengehalt von 131×10^6 Zellen pro Milz bedeutet dies, daß die Lymphozyten in der Milz in 24 h 2,5mal mit dem Blut ausgetauscht werden könnten. Die Ein- und Auswanderungsrate beträgt hierbei $13,9 \times 10^6$ Lymphozyten pro Stunde. Die in den Versuchen aufgetretene größte Veränderung der Milzlymphozytenzahl betrug in Versuch 3 (Tab. 12) ungefähr 100 Millionen Zellen, die innerhalb von 48 h aus dem Organ ab- bzw. innerhalb dieser Zeit wieder einwanderten. Das bedeutet eine maximale Anstiegs- bzw. Abfallrate von $2,0 \times 10^6$ Lymphozyten/h in der Milz. Die oben berechnete Lymphozytenrezirkulationsrate durch die Milz beträgt $13,9 \times 10^6$ Zellen/h. Sie ist damit siebenmal höher als die von uns gefundenen Anstiegs- bzw. Abfallraten. Die in den Versuchen aufgetretenen Schwankungen der Lymphozytenzahlen können damit durch geringe Veränderungen der normalen Lymphozytenrezirkulationsrate erklärt werden. So würde eine Verringerung der Lymphozyteneinwanderungsrate ($13,9 \times 10^6$ Zellen/h) um nur ein Siebtel bei unveränderter Auswanderungsrate ($13,9 \times 10^6$ Zellen/h) die Abnahme der Lymphozyten um 100 Millionen innerhalb von 48 h in der Milz bewirken.

Unter der Voraussetzung, daß die von Ford (59, 60) für die Ratte beschriebenen Verhältnisse der Lymphozytenrezirkulationsraten auf die Maus übertragbar sind, lassen sich die nach LL-Tumorinokulation in der Milz aufgetretenen Ab- und Zunahmen der Lymphozyten theoretisch gut erklären.

Auch in vivo berichten andere Untersucher über ähnlich große Schwankungen der Lymphozytenzahlen in der Milz nach Immunstimulation von Mäusen. Fulop und Osmond (62) injizierten C3H/H eJ-Mäusen 400×10^6 Schafserythrozyten intravenös und beobachteten zwei Tage später einen Anstieg der Lymphozytenzahl

von 55 auf 123×10^6 Zellen am vierten Tag nach Injektion. Dies entspricht einer Anstiegsrate von $1,4 \times 10^6$ Zellen pro Stunde. Die Zahl der in der Milz durch Proliferation neugebildeten Zellen war vernachlässigbar klein. Lala (100) beobachtete nach Transplantation eines Ehrlich Ascites Carcinoms auf CBA/H₆-Mäuse eine kontinuierliche Zunahme der Lymphozytenzahl in der Milz. Die minimale Einwanderungsrate der Lymphozyten stieg vom dritten Tag nach Tumordinokulation auf Werte, die bei mindestens $1,0 \times 10^6$ Zellen/h lagen. Die Zahl der in der Milz neugebildeten Lymphozyten betrug nur $1/3$ der eingewanderten Zellen. Umgekehrt zur Zunahme der Lymphozytenzahlen in der Milz konnten Fulop und Osmond (62) auch eine Abnahme der Lymphozyten von 54×10^6 Zellen auf 36×10^6 Zellen innerhalb der nächsten zwei Tage nach intravenöser Injektion von physiologischer Kochsalzlösung beobachten. Dies entspricht einer Abnahmegeschwindigkeit von $0,4 \times 10^6$ Lymphozyten/h. Auch nach Transplantation eines in Hale/Stoner-Mäusen spontan entstandenen Mammacarcinoms erfolgte innerhalb der ersten zwei Tage eine Abnahme der Zellzahl in der Milz um 100 Millionen, entsprechend einer Rate von $2,0 \times 10^6$ Zellen/h (137).

Die Veränderungen der Lymphozytenzahlen stimmen in diesen Beispielen (62, 100, 137) in ihrer zeitlichen Abfolge - zuerst Abnahme, dann Zunahme der Lymphozyten - und in ihrer Geschwindigkeit - Zunahmerate ($1,0 - 1,4$) $\times 10^6$ Zellen/h bzw. Abnahmerate ($0,4 - 2,0$) $\times 10^6$ Zellen/h gut mit unseren Ergebnissen überein.

Die Frage, warum es nach LL-Tumordinokulation zu den beobachteten Veränderungen der Lymphozyten in der Milz kommt, kann nur mit vagen Spekulationen beantwortet werden.

So könnte die zuerst auftretende Verringerung der Milzlymphozytenzahl auf einer Streßreaktion beruhen, nachdem bereits die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung in den Versuchen von Fulop und Osmond ebenfalls zur Abnahme der Lymphozyten führt. Der dem Abfall nachfolgende Anstieg der Milzlymphozytenzahl könnte auf einer mit dem Phänomen des "Antigen-Specific-Recruitment-Of-Lymphocytes" (ASRL) assoziierten unspezifischen Lymphozytenaggregation beruhen, die sich beide im lymphatischen Gewebe nach Antigenstimulation abspielen. Nach Antigeninjektion direkt in Lymphknoten oder in die Milz werden Lymphozyten mit dem für das Antigen spezifischen Paratop von den übrigen durch diese Organe zirkulierenden Lymphozyten herausselektioniert (58, 79, 167). Im Lymphknoten kommt es neben dem ASRL-Phänomen gleichzeitig zu einer unspezifischen massiven Anreicherung von Lymphozyten die keine für das Antigen spezifische Reaktionsfähigkeit besitzen. Eine Zunahme der Blutversorgung des Lymphknotens und damit verbunden eine erhöhte Zirkulationsrate an Lymphozyten und eine Abnahme der den Lymphknoten mit der Lymphe verlassenden Lymphozyten (sogen. "Shutdown") sind hierfür verantwortlich. Genauso wie im Lymphknoten spielt sich nach intravenöser Antigenapplikation das ASRL-Phänomen in der Milz ab (58, 167). Die Untersuchungen Fords (58) zeigen, daß es gleichzeitig zusammen mit dem ASRL-Phänomen auch zu einer Retention von Antigen unspezifischen Lymphozyten in der Milz kommt. LL-Tumorantigene könnten nach Eindringen in die Blutbahn die Zunahme der Lymphozyten durch eine mit dem ASRL-Phänomen verbundene unspezifische Lymphozytenaggregation verursachen. Tatsächlich können 5 - 7 Tage nach LL-Tumorinokulation erstmals Tumorantigene im Blut und in der Milz gefunden werden (15). Genau zu dieser Zeit sind die Lymphozyten in der Milz nach ihrem vorausgegangenen Abfall wieder angestiegen.

Leider gibt es keine Literatur über die Veränderungen der Lymphozytenpopulationen in der Milz während des Wachstums von LL-Tumoren. In der nachfolgenden Tabelle wurden die Veränderungen der T- und B-Zellen in der Milz während des Wachstums von anderen im Schrifttum beschriebenen Tumoren zusammengestellt. Diese Gegenüberstellung soll einen Eindruck des Spektrums der in diesem Organ sich während des Tumorstadiums abspielenden Veränderungen vermitteln und die Einordnung unserer im vorhergehenden Abschnitt aus dynamischer Sicht diskutierten Ergebnisse erlauben.

Tab. 17:

Fluktuation der absoluten B- und T-Zellzahlen in der Milz in verschiedenen Tumor-Wirt-Systemen.

Zellart:

T-Zellen	-	↑	-	↑	↓	-	↓
B-Zellen	-	-	↑	↑	-	↓	↓
Lit.:	16	150	50	92	?	?	103
	97		65	93			
			145	99			
				138			
				165			

Die Vielfalt der in der Milz während des Tumorstadiums sich abspielenden B- und T-Zellveränderungen umfaßt:

- weder Zu- noch Abnahme der B- und T-Zellen.

In den angegebenen Beispielen wurde eine Zunahme der Makrophagen bzw. Monozyten in der Milz beobachtet.

- eine isolierte Zunahme der T-Zellen;
- eine isolierte Zunahme der B-Zellen;
- eine Zunahme sowohl der T- und der B-Zellen;
und
- eine Abnahme sowohl der T- als auch der B-Zellen.

Im letzten Fall tritt, wie beim ersten, wieder eine dritte Zellart in der Milz auf, deren Anstieg zur Verdrängung der Lymphozyten führt. In den angegebenen Beispielen entwickelte sich eine Granulopoese.

Die durch das LL-Sarkom hervorgerufenen Milzzellveränderungen gehören in die letzte Gruppe der Tabelle, da das LL-Wachstum zu einer Abnahme der B- und T-Lymphozyten durch die in der Milz sich etablierende Granulopoese führt (Abb. 20 und Abb. 24 und 25).

5.1.3. Ursache und Bedeutung der Splenomegalie beim (LL-) Tumorwachstum

Die Vergrößerung der Milz ist eine nahezu regelmäßige Begleiterscheinung des progressiven Tumorwachstums. Sie beruht auf der Vermehrung einer oder mehrerer Zellarten, wie Makrophagen oder Monozyten (16, 97), lymphatischer Zellen (65, 93, 99, 138, 150) oder granulopoetischer Zellen. (103).

Auch das LL-Tumorwachstum führt zur Splenomegalie. Bei s.c.v. Milzen stellte sich eine bis zu dreifache Vergrößerung des Milzgewichtes ein (Abb. 17). Bei den i.a.g. Milzen stieg das Milzgewicht sogar bis zum Fünffachen an (Abb. 35). Hervorgerufen wurde die Splenomegalie während des LL-Tumorwachstums durch die in der Milz massiv auftretende Granulopoese (Abb. 24, 25 und Abb. 40). Die Splenomegalie war mit der Tumorsektion und der Tumorabstoßung reversibel (Ergebnisse nicht dargestellt). Aber auch die Steigerung der Erythropoese kann,

wie dies die Inokulationsversuche zeigen, zu einer Splenomegalie führen (Abb. 46).

Die Vergrößerung der Milz während des Tumorstwachstums darf daher als unspezifisches Zeichen der Zunahme ihres Zellgehalts aufgefaßt werden (16, 65, 93, 97, 99, 103, 138, 150).

Beruhet die Splenomegalie auf einer Hyperplasie des lymphatischen Gewebes, so kann die Vergrößerung der Milz als Ausdruck einer ineffektiven immunologischen Abwehr aufgefaßt werden. Risdall (138) zeigte eine inverse Beziehung zwischen der lymphatischen Hyperplasie in der Milz und der Tumormuninität der Tiere. Ähnlich bleibt die Lymphozytenvermehrung in der Milz aus, wenn Tumoren in allogene Tiere transplantiert werden, die die Tumoren abstoßen (194).

5.1.4. (LL-) Tumorstwachstum assoziierte Granulozytose

Weinberg fand während des Wachstums von LL-Tumoren in C57/B1/6 Cum-Mäusen Veränderungen der Milz und des Blutes, die gut mit unseren Ergebnissen in Einklang stehen (188).

Auch Weinberg beobachtete einen Anstieg des Milzgewichtes und der Milzzellzahlen. Die Splenomegalie beruhte wie in unseren Versuchen auf der Vermehrung erythropoetischer und granulopoetischer Zellen in der Milz. Ebenso trat eine Linksverschiebung unter den Zellen der Granulopoese auf. Abweichend von unseren Ergebnissen dominierte jedoch nicht die Granulopoese, sondern es erfolgte eine Verschiebung des normalen Verhältnisses myeloischer zu erythropoetischer Zellen zugunsten der Erythropoese. Möglicherweise beruht dieser Unterschied auf den hier und von Weinberg verwendeten verschiede-

nen Mausstämmen. Wolf und Trentin (193) konnten in (C57 x A)F₁-Mäusen zeigen, daß pluripotente Stammzellen in der Milz bevorzugt erythropoetische Kolonien bilden. Nach ihrer Ansicht würde das Milzstroma die erythropoetische Differenzierung von Stammzellen begünstigen. Wieder gut in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen stehen die von Weinberg beobachteten Veränderungen im Blut. Wie in unseren Versuchen (Abb. 27) steigen die Leukozyten auf Werte um 70 000 Zellen/ μ l 30 Tage nach Tumorinokulation an. Das Blutbild zeigt einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten bis auf Werte um 60 - 70 %. Interessant sind ebenfalls die Zellveränderungen im Knochenmark. Dort nimmt der Prozentsatz an teilungsfähigen granulopoetischen Zellen (Zellen des Proliferationspools) zuerst zu, fällt dann aber ab, während die reiferen Zellformen (Zellen des Reifungspools) vermehrt im Knochenmark auftreten. Diese Veränderungen stimmen in ihrer Reihenfolge genau mit denen des Blutbildes in unseren Versuchen überein. Hier zeigte sich, daß jedem Anstieg des Prozentsatzes an reifen Granulozyten eine Zunahme unreifer Zellen voraus ging (Abb. 14 und 15). Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Fluktuationen des Blutbildes im wesentlichen von der Zellbildung im Knochenmark bestimmt werden. Reineckes Berechnungen unterstützen dies (137). Danach finden nur 18 % der gesamten granulopoetischen Zellbildung in der Milz während des Wachstums eines transplantierten, spontan in Hale/Stoner-Mäusen entstandenen Tumors statt, der zu einer ähnlich hohen, wie von uns beobachteten Blutleukozytose führt. Die Milz leistet also nur einen relativ geringen Beitrag zur Granulozytenbildung. Weiterhin beobachtete Reinecke hämatologische Veränderungen, die mit unseren Ergebnissen nahezu identisch sind.

In Tab. 18 sind noch weitere, der Literatur entnommene Beispiele mit dem Tumorstadium assoziierter Granulozytosen, zusammengestellt.

Tab. 18:

Granulopoese induzierende Tumoren

Tumor	Wirt	Stammzellenproliferation						
		im Kn.mark		in der Milz		CSA im		Lit
		CFU _S	CFU _C	CFU _S	CFU _C	Se	Tu	
3 LL-Tumor	C57 Bl/6		+				+	(8)
3 LL-Tumor	C57 Bl/6	+						(7)
spontanes Mammaca.	Hale/Stoner	±	±	+	+			(137)
CE 1460 Mammaca.	CE		+				+	(44,46 104)
Fibrosarkom	(CBAT6T6 x C57 Bl)F ₁	+	+	+	+			(114)
NFSA-Fibro- sarkom	C3H/Bu			+			+	(17,11 149)
Ehrlich Ascites Ca.	CBA/Ht ₆			+				(100)
MCA induziert. Fibrosarkome	Balb/c							(91, 155)
MCA induziert. Ca.	Balb/c							(102)
VX ₂ -Ca.	New Zealand Kaninchen							(80)
spontan. Lymphom	AKR			+			+	(76)

CFU: Kolonien bildende Einheit; c: determiniert; s: nicht determiniert
 pluripotent

CSA:

Kolonienbildung stimulierende Aktivität

Se: Serum

Die beim LL-Tumorwachstum verstärkt auftretende Granulozytose ist also kein außergewöhnlicher Einzelfall. Ebenso wie beim Wachstum anderer Tumoren konnte für das LL-Sarkom im Knochenmark die Proliferation und Vermehrung von granulopoetisch determinierten kolonienbildenden Stammzellen ($G\text{-CFU}_C$) (8) und von pluripotenten nicht determinierten Stammzellen (CFU_S) (7) nachgewiesen werden. Untersuchungen über den Gehalt der Milz an CFU_C und CFU_S während des LL-Tumorwachstums sind in der Literatur nicht beschrieben. Aus der Beobachtung einer verstärkten Granulopoese in der Milz ist zu schließen, daß auch in diesem Organ vermehrt CFU_S und CFU_C während des LL-Tumorwachstums proliferieren.

Wie kommt es zur vermehrten Proliferation von determinierten Stammzellen während des Tumorwachstums?

In vielen Tumor-Wirt-Systemen konnte im Serum, im Urin oder im zellfreien Überstand von in vitro kultivierten Tumorzellen Faktoren nachgewiesen werden, die die Proliferation von Knochenmarkstammzellen in vitro fördern. Delmonte gelang es aus dem CE 1460 Mammacarcinom einen Granulozytose fördernden Faktor zu isolieren, der in normalen Mäusen einen bis zu dreißigfachen Anstieg der Granulozyten innerhalb von 3 bis 7 Stunden nach Injektion verursachte (44). Ein zweites Beispiel für die Isolierung eines die Kolonienbildung stimulierenden Faktors (CSF) aus dem Gewebe von NSFA-Tumoren liefert Sakai (149).

Die Bildung von CSF direkt im Tumor stellt eines der pathogenetischen Prinzipien dar, die zur Entwicklung einer Granulopoese während des Tumorwachstums führen.

Balducci (15) konnte im zellfreien Überstand von in vitro kultivierten LL-Tumorzellen eine die Knochenmarkstammzellen-kolonienbildung fördernde Aktivität (CSA) nachweisen. Auch wenn noch keine Isolation von CSF aus LL-Tumorgewebe bisher erfolgte, so sprechen Balduccis Ergebnisse für die Bildung von CSF in LL-Tumorzellen. Einige Beobachtungen in unseren Versuchen sprechen ebenfalls für die Auslösung der während des LL-Tumorstadiums einsetzenden Granulopoese durch CSF. Es trat eine gute Korrelation zwischen der durchschnittlichen Tumorstadiumsgeschwindigkeit ($\bar{V}$) und den die Kinetik der Granulopoese beschreibenden Größen, wie die Zeiten des Granulozytenanstieges und die Zeiten der Linksverschiebung (Abschnitt 4.3.2.) auf. Die Deutung dieser Beziehungen spricht für die CSF-Bildung in LL-Tumorzellen. Denn je schneller sich die Tumorzellzahl erhöht, desto mehr werden CSF gebildet, desto früher und stärker setzt die Granulopoese ein.

Andererseits wächst mit einer schnelleren Tumorzellvermehrung auch die Zahl zerfallender nekrotischer Zellen, die zu einer Granulopoese führen könnten. Mehrere Arbeiten entkräftigen jedoch diese Erklärungsmöglichkeit. Mit Einsetzen von Tumorzellnekrosen nehmen die CFU_g - und die CFU_c -Zahlen in der Milz ab (137). In einem anderen Tumor-Wirt-System konnte eine Granulozytose nur durch die Verabreichung von frischen homogenisierten Tumorzellen und nicht durch nekrotisches Tumorgewebe ausgelöst werden (102). Delmonte (46) fand, wie Ebbendorff-Tengberg (51) eine positive Korrelation zwischen der Masse an lebendem Tumorgewebe und dem Ausmaß granulopoetischer Veränderungen.

Geht man davon aus, daß nicht Nekroseprodukte, sondern in den LL-Tumorzellen gebildete CSF die Granulopoese verursachen, dann stellt sich die Frage, warum tiefgefrorene Tumorthomogenate, die in einer zum Tumorzellzerfall proportionalen Dosierung normalen Mäusen s.c. appliziert wurden, im Vergleich zum natürlichen Tumorstadium eine nur schwache Granulopoese in

der Milz induzieren.

Zum einen könnte der Gehalt an CSF des homogenisierten Tumorgewebes nicht ausreichen. Zum anderen könnten die CSF kälteempfindlich sein.

Wichtigstes Ergebnis der Tumorphomogenatinokulationsversuche ist jedoch, daß sie eine unspezifische granulopoetische Reaktion der Milz nach immunologischer Stimulation ausschließen. Dies hätte man aufgrund der Untersuchungen von Metcalf und Moore erwarten können, die nach Applikation verschiedener Antigene Zunahmen der CFU-Zahlen in der Milz beobachteten (112). Steigerungen der CFU-Zahlen wurden auch nach der Injektion von Leukämie und Polyzythämie induzierenden Viren (94, 154) und nach Impfung mit Bordetella pertussis (119) gefunden.

Von Interesse ist noch die Frage, inwiefern ein Zusammenhang zwischen der Eigenschaft des LL-Sarkoms zur Lungenmetastasierung und seiner granulopoeseinduzierenden Wirkung besteht. Beim Menschen sind Tumoren, die zu einer Granulozytose führen, häufig pulmonalen Ursprungs (5, 53, 139, 151). Das Lewis Lung Sarkom zeichnet sich, wie bei seiner Bezeichnung berücksichtigt wurde, durch eine ausgeprägte Lungenmetastasierung aus. Auch das VX₂-Carcinom des Kaninchens metastasiert bevorzugt in die Lunge. Für diesen Tumor konnte eine gute Korrelation zwischen dem Grad der Lungenmetastasierung und der Höhe der Blutgranulozytose aufgezeigt werden (80). Neben der Lungenmetastasierung und der granulopoeseinduzierenden Wirkung ist dem LL-Sarkom und dem VX₂-Carcinom noch ihre Fähigkeit zur Bildung von Prostaglandin E gemeinsam. Möglicherweise könnte der metastatische Lungenbefall neben der CSF-Bildung in den Tumorzellen selbst noch eine zusätzliche CSF-Produktion im Lungengewebe auslösen. Bei der Maus stellt die Lunge nämlich einen wichtigen Bildungsort von CSF dar (159). Wenn auch in jüngster Zeit durch die Untersuchungen von

Burlington (26) das Konzept der Regulation der Granulopoese durch CSF neoplastischen Ursprungs in Frage gestellt wurde und damit andere Erklärungsmöglichkeiten der tumorassoziierten Granulopoese wieder an Bedeutung gewinnen, seien diese nur kurz erwähnt. Hierzu zählt als Ursache einer leukämoiden Reaktion die bakterielle Infektion von Tumoren. Da selbst während eines subkutanen Abszesses bei einem der Versuchstiere, das Tumorphomogenate erhalten hatte, sich im Splenogramm nur eine geringe Vermehrung der Granulozyten zeigte, scheidet Infektion als Ursache der Granulopoese Steigerung beim LL-Tumorwachstum aus. Keine Abhängigkeit der mit dem Wachstum von Tumoren auftretenden Granulozytose von der An- bzw. Abwesenheit einer Infektion berichten ebenfalls andere Arbeiten (11, 46). Als weitere Ursachen einer leukämoiden Reaktion kommen die direkte Irritation des Knochenmarks durch Metastasen, eine Stimulation von Knochenmarkstammzellen durch Tumorantigene (111), eine Verlängerung der Überlebenszeit der Granulozyten im Blut (20) und ein erhöhter Granulozytenverbrauch im Tumor in Frage, der zu einer erhöhten Freisetzung von CSF aus zerfallenden Granulozyten führt, die im Sinne eines positiven Feedbacks die Granulopoese weiter steigern (140). Denkbar wäre auch die Auslösung einer Granulozytose durch vermehrte Ausschüttung von Kortikoiden durch Stress während des Tumorwachstums. Es sei weiterhin darauf hingewiesen, daß die Auslösung einer leukämoiden Reaktion durch einen Granulopoese induzierenden Tumor auch vom Wirt abhängen kann (45, 91, 155).

Bei Betrachtung unserer und der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse kann der Schluß gezogen werden, daß die während des LL-Tumorwachstums auftretende Granulopoese auf der Bildung von Faktoren in den Tumorzellen beruht, die die Proliferation von granulopoetisch determinierten Stammzellen fördern. Eine unspezifische Reaktion des hämatopoetischen Gewebes der Milz konnte ausgeschlossen werden.

5.1.5. CA-Veränderungen granulopoetischer Milzzellen

Die Ursachen der beobachteten Chemilumineszenzveränderungen sind vielschichtig und schwer analysierbar.

An Hand einiger Beispiele sollen Faktoren aufgezeigt werden, die die Chemilumineszenzantwort neutrophiler Granulozyten in den Versuchen möglicherweise gefördert bzw. gehemmt haben können.

Lopez (107) konnte mit gereinigtem Mäuse-CSF die Antikörper vermittelte Zytotoxizität (ADCC) von neutrophilen Granulozyten gegenüber Thymomzellen erhöhen. Auch Vadas (183) zeigte beim Menschen eine Steigerung der ADCC von neutrophilen Granulozyten durch CSF. Da die ADCC von Granulozyten wohl vorwiegend auf der Bildung toxischer Sauerstoffprodukte beruht (21, 43), ist es vorstellbar, daß die Aktivierung von Granulozyten durch CSF auch mit einer erhöhten Produktionskapazität von Sauerstoffderivaten einhergeht. Wie oben diskutiert, bildet wahrscheinlich auch das LL-Sarkom CSF oder CSF ähnliche Substanzen, die somit nicht nur die Etablierung der Granulopoese, sondern auch die erhöhte CA der Zellen bewirken. In Ergänzung hierzu konnte bei mehreren Mäusetumoren die Bildung von Faktoren mit CSF ähnlichen Eigenschaften nachgewiesen werden, die zu einer Steigerung der ADCC humaner neutrophiler Granulozyten führen (182).

Eine weitere Erklärung für die Steigerung der CA nach Tumorinokulation besteht in der Stimulation von Granulozyten durch Lymphokine, die die Superoxidanionenproduktion erhöhen (156). Darüberhinaus vermögen Lymphokine weitere Zellfunktionen neutrophiler Granulozyten, wie die ebenfalls von Chemilumineszenz begleitete Phagozytose weiter zu steigern (89, 90). Auch Immunkomplexe, die über Fc-Rezeptoren an die Granulozytenmembran binden, führen zu Chemilumineszenz. Dies konnte

für experimentell (12,169) und für in vivo während des Tumorstwachstums entstandene Immunkomplexe (192) gezeigt werden. Ebenso führt aggregiertes Immunglobulin G zur Chemilumineszenz über Bindung an Fc-Rezeptoren (69, 169). Dies spielt zwar in vivo keine Rolle, erklärt aber die Wirkungsverstärkung dieses Stimulus in der Anwesenheit von Serum durch die Wirkung von Komplementspaltprodukten. Komplementspaltprodukte, wie C3 b und C5 a, die als potente Auslöser des respiratory burst gelten (69), könnten als Folge einer Komplementaktivierung durch die während des Tumorstwachstums vermehrt gebildeten Immunkomplexe eine weitere Erklärung für die erhöhte Chemilumineszenzantwort sein.

Dieser sicherlich unvollständigen Auflistung, die Chemilumineszenz von Granulozyten fördernden bzw. auslösenden Faktoren (CSF, Lymphokine, Immunkomplexe, Komplementspaltprodukte), stehen Faktoren mit chemilumineszenzhemmender Wirkung gegenüber.

So widersprüchlich es auch erscheinen mag, es sind hier wieder die Immunkomplexe zu nennen. Sie regen Zellen nicht nur zur Chemilumineszenz an, sondern sie hemmen sie auch. Doll (48) beschreibt einen Chemilumineszenzassay zur Bestimmung von Immunkomplexen. Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit Immunkomplexen für 30 Min. führt zu einer von der Immunkomplexkonzentration abhängigen Abnahme der mit opsoniertem Zymosan an den gewaschenen Zellen ausgelösten Chemilumineszenzantwort. Ähnliches fand Starkebaum für die Fähigkeit von Granulozyten, Immunkomplexe zu phagozytieren (168). Granulozyten zeigten eine dosisabhängige Hemmung ihrer Phagozytoserate, wenn sie vorher mit Immunkomplexen inkubiert worden waren. Erfolgte die Erstinkubation der Zellen mit Immunkomplexen in der Anwesenheit von Natriumzyanid oder -azid, beides Verbindungen, die Hämenzyme, wie z. B. die Myeloperoxidase (MPO) hemmen, dann blieb die immunkomplexinduzierte Hemmwirkung auf die Phagozytose aus. Die Autoren

kamen zu der Schlußfolgerung, daß die Immunkomplexe beim Erstkontakt mit den Granulozyten eine Stoffwechselaktivierung verursachen, bei der MPO abhängig gebildete toxische Produkte zu einer Fc-Rezeptordenaturierung oder -verlust führen. Auch aus den Untersuchungen von Hakansson (72) geht hervor, daß stimulierte Granulozyten genügend Elastase und Trypsin, sowie MPO und H_2O_2 extrazellulär freisetzen, um eine Schädigung des C3 b- und Fc-Rezeptors hervorzurufen. Die Verminderung der Chemilumineszenzantwort gegenüber Zymosan und die Verringerung der Phagozytose von Granulozyten nach Kontakt mit Immunkomplexen könnte also auf der Schädigung der Zellen durch ihre eigenen nach Zellstimulation entstandenen Stoffwechselprodukte beruhen. Eine besondere Rolle scheint hierbei die MPO zu spielen, deren Substrat das im "respiratory burst" gebildete H_2O_2 ist. In Ergänzung zur Reduktion der Chemilumineszenzantwort von Granulozyten durch Präinkubation mit Immunkomplexen steht die Beobachtung, daß die Bakterizidität von immunkomplexbeladenen Granulozyten ebenfalls reduziert ist (101, 109). Im Rahmen der durch Immunkomplexe induzierten Zellfunktionsstörungen ist die Beobachtung einer negativen Korrelation zwischen der Höhe des IgG-Spiegels und der Phagozytose im Blut von Tumorpatienten erwähnenswert (61).

Auch die in unseren Versuchen aufgetretenen Chemilumineszenzaktivitätserniedrigungen könnten auf der Bindung von IgG-haltigen Immunkomplexen an die Granulozyten beruhen. Daß die Mikrophagen während des Tumorwachstums zeitweise Immunglobuline tragen, geht aus folgenden Überlegungen hervor.

Beim Vergleich von Abb. 7 mit Abb. 12 zeigt sich, daß 22 Tage nach LL-Tumorinokulation der prozentuale Anteil an IgG tragenden Milzzellen ungefähr zweimal höher ist, als der prozentuale Anteil der Lymphozyten unter den Milzzellen. Selbst wenn alle Lymphozyten Immunglobuline tragen würden, so könnten sie nur die Hälfte des Prozentsatzes IgG positiver Zellen unter den Milzzellen ausmachen. Dies bedeutet, daß neben den

Lymphozyten noch eine andere Zellart Immunglobuline trägt. In Frage kommen die Zellen der Granulopoese, da sie über Fc-Rezeptoren Immunglobuline binden können. Da 22 Tage nach Tumorinokulation die granulopoetischen Zellformen im Milzaspirat mit ca. 65 % den Hauptanteil einnehmen und diese Zellart über Fc-Rezeptoren Immunglobuline binden kann, trugen neben den Lymphozyten die Granulozyten Immunglobuline. Tatsächlich konnten im Blickfeld des Immunfluoreszenzmikroskopes grünfluoreszierende Zellen bei Betrachtung mit ungefiltertem Licht als granulopoetische Zellformen identifiziert werden. Bei Ansteigen der Prozentwerte Ig bzw. IgG positiver Zellen (Abb. 11 und 12) über die Prozentwerte der Lymphozyten unter den Milzzellen (Abb. 7) tragen folglich auch die granulopoetischen Zellformen Immunglobuline. In Versuch 1, 2, 3 und 4 war dies 13, 16, 8 und 15 Tage nach der Tumorinokulation rein rechnerisch erstmals der Fall. Passend zur Erklärung immunkomplexinduzierter CA-Erniedrigung fällt in Versuch 3 das CA-Minimum in die Zeit höchster prozentualer Anteile IgG positiver Zellen unter den granulopoetischen Zellformen (Ergebnis nicht dargestellt). Bellellis Untersuchungen berechtigen zur Annahme, daß das an die Oberfläche der Granulozyten gebundene IgG, Bestandteil von Immunkomplexen ist, die LL-Tumorantigene enthalten (15). Eine Modulation der CA durch IgG-LL-Tumorantigen-Immunkomplexe erscheint somit in unseren Versuchen wahrscheinlich. Allerdings abweichend hiervon lagen die Verhältnisse im vierten Versuch. Offensichtlich spielen neben den Immunkomplexen noch andere die Chemilumineszenzaktivität hemmende Faktoren eine Rolle. Hierunter fällt das Prostaglandin E, das von LL-Tumorzellen gebildet wird (197). Möglicherweise ist auch ein von LL-Zellen produzierter immunmodulierender Faktor niedrigen Molekulargewichtes mit lipidähnlichen Eigenschaften mit Prostaglandinen identisch (198). Dieser Faktor verändert die Funktion von Lymphozyten und Makrophagen in der gleichen Weise wie Prostaglandine. So hemmt er die Con

A induzierte Lymphozytenproliferation und fördert die Makrophagenmigration, wie dies für Makrophagen, die mit PgE_2 inkubiert werden, gezeigt wurde (196). Darüber hinaus hemmt er die LPS induzierte Zytotoxizität von Makrophagen gegenüber Tumorzellen. Ähnlich reduziert PgE_2 die Makrophagenzytotoxizität gegenüber Tumorzellen und führt zu einer ausgeprägten Hemmung der Chemilumineszenz (187). Da mit fortschreitendem LL-Tumorstadium eine parallele Entwicklung der Prostaglandinproduktion zu erwarten ist, kann die intermittierend auftretende Hemmung der Chemilumineszenzaktivität nicht allein auf einer kurzfristigen Zunahme der Prostaglandinproduktion beruhen. Allerdings gut in Einklang mit der Bildung chemilumineszenzhemmender Prostaglandine durch LL-Tumorzellen stehen die Ergebnisse der Verdünnungsversuche (Tab. 4). Hier zeigte sich, daß der zellfreie Überstand von suspendiertem Milzgewebe, die CA in jeder Phase des Tumorstadiums stark hemmte. Einzuwenden bleibt, daß der Hemmeffekt auch auf bloßer Photoabsorption durch Verunreinigungen in den zellfreien Überständen beruhen könnte. Eine Verringerung der CA wäre auch mit einem Quencheffekt begründbar, der durch die im Meßansatz vorhandenen Erythrozyten hervorgerufen wird. Wie jedoch Abb. 34 zeigt, bestehen keine Beziehungen zwischen der Erythrozytenkonzentration im Meßansatz und den CA-Veränderungen. Ebenso wenig kann das zwischen den beiden Maxima liegende Minimum nicht auf eine Verschiebung des Verhältnisses reifer Granulozyten zugunsten unreifer granulopoetischer Zellformen zurückgeführt werden. Eine Zunahme des Anteils unreifer granulopoetischer Zellformen unter den Zellen im Meßansatz könnte allerdings der gegen Versuchsende auftretenden Abnahme der CA zu Grunde liegen. Eine geringere Chemilumineszenzantwort ist bei unreifen granulopoetischen Zellformen zu erwarten, weil ihre Fähigkeit Superoxidanionen zu bilden sich erst mit der Reifung der Zellen ausbildet (88).

Zu den in unseren Versuchen die CA von granulopoetischen Zellen möglicherweise fördernden Faktoren zählen:

CSF (21, 43, 182, 183), Lymphokine (89, 90, 156), Immunkomplexe (12, 169, 192), Komplementspaltprodukte (69).

Die Faktoren mit potentiell hemmender Wirkung umfassen:

Immunkomplexe (48), Prostaglandin E (187), Quencheffekte, Unreife granulopoetischer Zellformen (88).

5.1.6. Hemmen Granulozyten das Wachstum von LL-Tumoren?

Es gibt eine ganze Reihe von Arbeiten, die zeigen, daß Granulozyten Tumorzellen abtöten können. Danach wirken Granulozyten in drei Situationen auf Tumorzellen zytotoxisch.

Erstens während der Phagozytose inerte Partikel (37), zweitens bei der Anwesenheit von zellaktivierenden löslichen Substanzen (39, 41, 121) und drittens bei der Anwesenheit von spezifisch gegen die Zielzellen gerichteten Antikörpern (38, 63, 71).

Für die Zerstörung von Tumorzellen stehen den Granulozyten eine ganze Reihe von Mechanismen zur Verfügung. Mikrophagen können Fibroblasten von Oberflächen enzymatischen ablösen (43). Möglicherweise werden Tumorzellen aus ihrem Verband im Gewebe durch ähnliche Mechanismen herausgelöst und damit zellzerstörenden Einflüssen leichter zugänglich gemacht. Kationische Proteine (40) und spezielle Esterasen (64) sind weitere Komponenten bei der Zerstörung von Tumorzellen, die Granulozyten durch Degranulation extrazellulär abgeben. Die Myeloperoxidase (MPO), ein ebenfalls in den spezifischen Granula des Granulozyten vorhandenes Enzym, wirkt zusammen mit Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) und Halogenidionen (Cl^- , Br^- , J^-) auf Tumorzellen zytotoxisch (41). Allerdings soll dieses

System bei der Antikörper vermittelten Zytotoxizität (ADCC) der Granulozyten von untergeordneter Bedeutung sein. Hier sind es vor allem neben H_2O_2 andere aktivierte Sauerstoffspezies, die während des gesteigerten oxidativen Metabolismus im "respiratory burst" gebildet werden (71).

Auch aus unseren Versuchen geht hervor, daß das Wachstum der LL-Tumoren um so früher eine Einschränkung erfährt, je schneller und stärker die Granulopoese einsetzt

$(t_{K_{Max1}} - t(\uparrow PMN))$ und $(t(K)_{Max1} - t(Lv))$ (siehe Abb. 4.3.2.). Es bleibt zu fragen, ob diese Beziehungen nur formal oder doch kausal sind.

Hemmen wirklich Granulozyten das LL-Tumorwachstum?

Dafür spricht die Fähigkeit der Granulozyten zur spezifischen Antikörper vermittelten und unspezifischen Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen. Wie bereits oben aufgezeigt belegen dies zahlreiche Arbeiten.

Bedeutet eine erhöhte CA eine gesteigerte Produktion von reaktiven O_2 -Spezies (3, 35, 36, 86, 143, 186) und damit eine verstärkte Zytotoxizität (41, 71) von Granulozyten, dann spricht das Erreichen maximaler CA kurz vor (Tab. 5 V4) und zu den Zeiten abnehmender Tumorwachstumsgeschwindigkeiten (Tab. 5 V3) auch für die Hemmung der Tumorentwicklung durch die Mikrophagen.

Für die Ablehnung der eingangs gestellten Frage kommen alle Faktoren in Betracht, die neben den Granulozyten das Tumorstadium auch verzögern können. Hierzu zählen alle zellulären und humoralen Abwehrmechanismen.

Zu den nicht immunologischen Faktoren, die auf das Tumorstadium limitierende Wirkung haben, gehört die Vaskularisation. Tannocks Untersuchungen (174) zeigen die Bedeutung dieses Faktors auf. Anhand von Tabelle 3 soll beantwortet werden, ob die bei der LL-Tumorentwicklung beobachteten Abnahmen der Wachstumsgeschwindigkeiten auf Veränderungen der Vaskularisation beruhen könnten.

Zwischen den zu $t(\bar{k}_{\text{Max } 1})$ gemessenen $B \times L$ Produkten ($p < 0,01$) bestehen hochsignifikante Unterschiede. Dies bedeutet, daß sich die Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumoren im frühen Stadium bei ganz unterschiedlichen Tumorgrößen, also unabhängig vom Tumolvolumen, verringern. Stellte die Vaskularisation den begrenzenden Faktor, dann hätte man erwarten können, daß bei Überschreiten einer bestimmten, definierten Größe, die Tumoren in ihrem Wachstum gehemmt werden würden. Es fand sich jedoch eine Verringerung der Tumorwachstumsgeschwindigkeiten unabhängig vom Tumorgewicht. Im Gegensatz hierzu könnte die später zu $t(\bar{k}_{\text{Max } 2})$ erneute Abnahme des Tumorwachstums auf einer unzureichenden Vaskularisation der Tumoren beruhen. Denn wie zu fordern erfolgt die Reduktion der Tumorwachstumsgeschwindigkeiten bei Erreichen von Tumorgrößen, die sich voneinander nicht signifikant unterscheiden (Tab. 3).

Die in der Literatur gut belegte Fähigkeit der Granulozyten zur Tumorzellzytotoxizität (37, 38, 39, 41, 63, 71, 121), die zeitliche Koinzidenz zwischen den Zeiten abnehmender Tumorwachstumsgeschwindigkeiten und den Zeiten der maximalen CA (Tab. 5) und der Wegfall der Vaskularisation als Ursache verzögerter Tumorentwicklung, lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß Granulozyten das LL-Tumorwachstum hemmen.

Kritisch betrachtet stützt sich diese Auffassung natürlich nur auf die Interpretation einer rechnerischen Beziehung. Es wäre daher wünschenswert, die Fähigkeit der Granulozyten zur Tumorzellzerstörung während des LL-Tumorwachstums direkt *in vitro* zu überprüfen.

5.2. Methodik

5.2.1. Messung des Tumorwachstums

Ausgehend von der Überlegung, daß das Wachstum von Tumoren unter idealen Bedingungen auf der Zweiteilung von proliferierenden Zellen periodisch, d. h. mit gleichbleibendem zeitlichen Abstand, erfolgt, müßte die Kinetik des Tumorwachstums durch eine einfache Exponentialfunktion zu beschreiben sein (6). Wie jedoch die Volumenmessungen wachsender solider Tumoren im Tierversuch zeigen, nimmt die Tumorummenverdoppelungszeit mit fortschreitender Tumorgröße zu. Dies bedeutet, daß die Tumoren in ihrem Wachstum mit zunehmender Größe immer mehr von ihrem initialen exponentiellen Wachstum abweichen und sich langsamer entwickeln, bis sie schließlich eine obere Grenze erreichen. Natürliches Tumorwachstum kann also zunächst durch eine Exponentialfunktion mit der Wachstumsquote k als Exponent beschrieben werden. Später bleibt k nicht mehr konstant, sondern nimmt stark ab. Die Geschwindigkeit mit der der Exponent k kleiner wird, ist selbst ein exponentieller Vorgang, d. h. die Hemmung der Tumorentwicklung und damit der Anstieg der Tumorummenverdoppelungszeit wachsen exponentiell an. In der Gompertzschen Gleichung sind beide Vorgänge zusammengefaßt. Laird (98) zeigte die Gültigkeit der Gompertzschen Gleichung für zahlreiche solide Tumoren der Maus, der Ratte und des Kaninchens auf. Auch das Wachstum der LL-Tumoren kann gut durch die Gompertzsche Gleichung beschrieben werden (24, 47, 110). In Übereinstimmung hiermit finden wir eine zunehmende Abnahme der mittleren Wachstumsquoten (Abb. 30). Dies ist jedoch nichts außergewöhnliches. Besonders hervorzuheben ist aber, daß in allen Versuchen mit Hilfe der Berechnung der mittleren Quote $K(t)$ in Abhängigkeit von der Zeit, mit gesetzmäßiger Regelmäßigkeit Phasen während des Tumorwachstums beobachtet werden

konnten, in welchen die Volumenwachstumsgeschwindigkeiten der Tumoren beschleunigt oder verzögert waren (Abb. 30). Entsprechend der Gompertzschen Gleichung, die von einer konstanten mit exponentieller Geschwindigkeit erfolgenden Abnahme der Quote k ausgeht, hätten Phasen, in denen Tumoren beschleunigt wachsen, d. h. Phasen mit Steigerungen der Quote $K(t)$, nicht beobachtet werden dürfen. Dieser scheinbare Widerspruch löst sich leicht, denn die Gompertzsche Gleichung beschreibt das Wachstum von Tumoren als Annäherung über den gesamten Verlauf der Tumorentwicklung. Bei der Beschreibung des Tumorwachstums durch die Gompertzsche Gleichung gehen damit Informationen über die exakte Entwicklung der Quote k in den verschiedenen Phasen während der Tumorentwicklung verloren.

Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren erlaubt hingegen, die Art der Änderung der momentanen Wachstumsquote k individuell für jeden einzelnen Tumor während seiner Entwicklung zu erfassen.

Diese einfach durchzuführende Methode könnte auch bei anderen Aufgabenstellungen, wie z. B. die Beurteilung von Tumorthapien, in Form eines einfachen Screeningtests von Nutzen sein. Änderungen von $K(t)$ könnten dann mit aufwendigeren autoradiographischen Verfahren näher analysiert werden.

5.2.2. Feinnadelaspirationsbiopsie

Unter der Feinnadelaspirationsbiopsie versteht man die mikroskopische Untersuchung von am Lebenden durch Feinnadelpunktion gewonnenem Material. Diese Methode hat bereits früh in der Tumordiagnostik (128) und auch in jüngster Zeit in der Diagnose akut zellulärer Abstoßungsreaktionen in transplantierten Organen (70) Anwendung gefunden. Möschlin (118)

studierte die Morphologie von Milzzellen des Menschen, die er als erster durch Punktion von Milzen erhalten hatte. Angeregt wurde die Kombination der Feinnadelaspirationsbiopsiemethode mit der subkutanen Verlagerung der Milz durch die Arbeit von Weiss und Hess (189), die bei Ratten die Milz für ihre Untersuchungen, allerdings unter Unterbindung der portolienalen Gefäße, subkutan verlagerten.

Die Feinnadelaspirationsbiopsie an subkutan verlager-
ten Milzen ermöglichte es jetzt zum erstenmal

- die zellulären Veränderungen in der Milz des einzelnen Versuchstieres während des Tumorwachstums individuell zu bestimmen,
- bei beliebiger Wiederholbarkeit der Technik ein hohes zeitliches Auflösungsvermögen zu erreichen,
- nicht nur qualitative, sondern erstmals auch quantitative Aussagen über Zellveränderungen in der Milz zu erhalten,
- Versuchstiere durch die nun nicht mehr notwendige Splenektomie, wie sie früher für die Durchführung ähnlicher Versuche erforderlich war, einzusparen.

Voraussetzung für die Anwendung dieses Untersuchungsmodells ist, daß sich die Zellveränderungen in den s.c.v. Milzen in der zeitlichen Reihenfolge genauso abspielen, wie bei intra-abdominaler Lage der Organe. Dies konnte als zutreffend gezeigt werden (Abs. 4.5.2.). Allerdings verlaufen die Zellveränderungen in den s.c.v. Milzen langsamer und weniger ausgeprägt. Wahrscheinlich beruht dies auf der venösen Stase der Milzen, die nach ihrer subkutanen Verlagerung auftritt

(Tab. 6). Verschiedene Tumorwachstumsgeschwindigkeiten als Ursache für die verzögerten Zellveränderungen in den s.c.v. Milzen scheiden aus, da die inokulierten Tumorzellzahlen in den beiden Gruppen gleich hoch waren (Abs. 3.1.15.1.). Bei Verminderung oder Normalisierung der venösen Stauung durch Verbesserung der chirurgischen Technik dürfte eine Beschleunigung und Intensivierung der Zellveränderungen während des Tumorwachstums erwartet werden.

Ein weiterer wichtiger, gegenüber der Feinnadelbiopsiemethode einzuwendender Kritikpunkt konnte widerlegt werden. Nämlich die Frage, ob nicht bei der Entnahme der Milzgewebeprobe anstelle von Milzgewebe vorwiegend Blut aspiriert wird. Besonders bei venös gestauten Milzen ist dies von Bedeutung. Wie die Berechnungen zeigen (Abb. 28) ist der Anteil der aus dem Blut stammenden Leukozyten unter den in der Milzgewebeprobe enthaltenen Leukozyten mit durchschnittlich 5,0 % innerhalb der ersten 10 Tage nach Tumoringokulation vernachlässigbar klein. Nachfolgende Überlegungen zeigen, daß dieser Prozentsatz in Wirklichkeit noch viel niedriger ist. Entsprechend der Formel zur Berechnung der Zahl aus dem Blut stammender Leukozyten/ μ l Suspension (L_{blut}) (Abs. 3.1.11.) wurde das L/E-Verhältnis des peripheren Blutes mit der Erythrozytenkonzentration in der suspendierten Milzgewebeprobe multipliziert. Dabei wird angenommen, daß die in der Milzgewebesuspension enthaltenen Erythrozyten (E_s) alle aus aspiriertem Blut stammen. Da die Milz Erythrozyten nicht nur sequestrieren, sondern selbst auch bilden kann, setzt sich E_s aus drei Teilen zusammen. Aus einem Teil, der wirklich durch die Verunreinigung der Milzgewebeprobe mit Blut bedingt ist und aus dem sequestrierten und gebildeten Anteil. Um die letzten beiden Anteile berechnet sich L_{blut} in der Formel zu hoch. Bei kleinen L/E-Verhältnissen des peripheren Blutes macht sich dieser Fehler kaum bemerkbar. Er wächst aber mit steigendem L/E-Verhältnis, das mit fortschreitendem Tumorsta-

dium durch die ausgeprägte Entwicklung der Blutleukozytose und durch die Abnahme der Erythrozytenkonzentration in Folge der Tumoranämie sehr schnell von Tag 0 auf Tag 34 um den Faktor 75 ansteigt. Dies erklärt den starken Zuwachs von L_{blut} unter den Leukozyten der Milzgewebeprobe L_{ges} ($L_{\text{ges}} = L_{\text{blut}} + L_{\text{par}}$) bis auf durchschnittlich 18,0% im fortgeschrittenen Tumorstadium. Aber auch die unterschiedlichen Entwicklungen der verschiedenen granulopoetischen Zellformen im Blut und in der Milz (vgl. Abb. 8, 9 mit Abb. 14, 15) bestätigen, daß die Verunreinigung der aus dem Milzparenchym stammenden Leukozyten (L_{par}) durch die aspirierten Blutleukozyten (L_{blut}) bedeutungslos ist.

Ein weiterer Vorteil des Versuchsmodells besteht darin, daß Veränderungen der Milz während des selten auftretenden Ereignisses der spontanen Tumorregression im gleichen Tier analysiert werden können.

Das Untersuchungssystem zeichnet sich außerdem durch eine große Sparsamkeit an Versuchstieren aus. So hätte man, um die gleiche Anzahl an Versuchsdaten zu gewinnen, 846 Tiere splenektomieren müssen, während durch Feinnadelpunktion subkutan verlagelter Milzen nur 36 Tiere ausreichten. Dies entspricht einer Tierersparnis von 95,8 %.

5.2.3. Messung der Chemilumineszenz

Unter Chemilumineszenz versteht man die Aussendung von Licht bei exergonisch ablaufenden chemischen Reaktionen. Allen war der erste, der Chemilumineszenz beim Granulozyten beschrieb (3). Die native Chemilumineszenz dieser Zellen beruht auf der Produktion von aktivierten Sauerstoffderivaten (3, 35, 36, 86, 143, 186), die entweder selbst (singlet oxygen) unter Rückkehr in ihren Grundzustand oder durch Oxygenation von organischen Molekülen und deren Rückkehr in einen energieärmeren Zustand, Licht aussenden. Die vom Glucosestoffwechsel

abhängig gebildeten aktivierten Sauerstoffderivate sollen die Chemilumineszenz von Arachidonsäuremetaboliten im glucose-unabhängigen Lipo- und Cyclooxygenasestoffwechsel verstärken können (36, 166).

Die Messung der Chemilumineszenz gestattet somit als einfach durchzuführende Methode die Bildung aktivierter O_2 -Spezies in Zellen quantitativ zu erfassen (3, 35, 36, 86, 143, 166, 186).

Die Größe der Chemilumineszenzantwort der Zellen hängt in einem Chemilumineszenzmeßansatz im wesentlichen von der Stärke des Stimulus und von der Stimulierbarkeit der Zelle ab. In einem Chemilumineszenzassay kann deshalb bevorzugt die Stärke des Stimulus, die Stimulierbarkeit der Zelle oder beides gemeinsam gemessen werden. Im Chemilumineszenzassay dieser Arbeit sollten im Sinne eines Screeningtests beide Komponenten, d. h. mögliche Änderungen der Wirkungsintensität des Stimulus und Änderungen der Stimulierbarkeit der Zellen, in die Größe der Chemilumineszenzantwort eingehen. Die Größen, von welchen erwartet werden konnte, daß sie im Meßansatz dieser Arbeit Einfluß nehmen umfassen:

- nicht opsoniertes Zymosan
- humorale Faktoren, aus der im Meßansatz jedoch nur in geringer Menge enthaltenen extrazellulären Milzgewebeflüssigkeit (Abs. 3.1.12.2.)
- und die Stimulierbarkeit der Zellen

Nicht opsoniertes Zymosan, ein Produkt, das aus Hefezellen gewonnen wird, vermag im Serum die Komplementkaskade über den alternativen Weg zu aktivieren. Hierbei wird Zymosan vom

Komplementspaltprodukt C3b bedeckt (52, 142). Auch binden sich im Serum vorkommende IgG-Antikörper an Zymosan (18). Durch beide Mechanismen wird die Bindung von Zymosan an die Oberfläche neutrophiler Granulozyten über C3b- und Fc-Rezeptoren gefördert. Ein Vorgang der als Opsonisation bekannt ist. Der sich daran anschließende "respiratory burst", so bezeichnet man die extrarespiratorische Mehraufnahme von Sauerstoff und die Bildung von aktivierten O_2 -Spezies, beruht hierbei sowohl auf der Betätigung des C3b- und des Fc-Rezeptors der Zelle, als auch möglicherweise auf der Interaktion des Zymosans mit "Zymosanrezeptoren" (42). Das bei der durch Zymosan auf dem alternativen Weg ausgelösten Komplementaktivierung entstandene, chemotaktische wirksame Spaltprodukt C5a (185) kann ebenfalls zur Auslösung eines "respiratory burst" führen (164). Diese Wege, über die Zymosen zur Aktivierung von Zellen führen kann, zeigen, daß humorale Faktoren (Opsonine: Komplement, Antikörper) die Stärke des zellenaktivierenden Stimulus Zymosan positiv verändern können. Auch eine negative Beeinflussung des Stimulus durch humorale Faktoren wäre denkbar. Ebenso können humorale Faktoren die Reaktivität der Zellen im Meßansatz positiv oder negativ beeinflussen. Aber nicht nur in vitro, sondern auch in vivo gehen Faktoren (humoral, zellulär) in die Höhe der Chemilumineszenzantwort ein, die vor Entnahme den Aktivitätszustand der Zellen beeinflussten. Dies bedeutet, daß die Höhe der Chemilumineszenzantwort im Meßansatz dieser Arbeit das Resultat von fördernden und hemmenden Faktoren darstellt, die in vivo und in vitro die Stimulierbarkeit der Zellen und in vitro auch die Wirkungsintensität des Stimulus modifizieren. Die beiden letzten Möglichkeiten wurden in Verdünnungsversuchen überprüft (Abs. 3.1.12.2.).

5.3. Versuchsergebnisse zur zweiten Teilfrage

5.3.1. Auswirkungen der Splenektomie auf das (LL-)Tumorzustum

Im zweiten Teil unserer Arbeit beschäftigen wir uns mit dem Einfluß der Milz auf das Wachstum von Lewis-Lung-Tumoren. Hierzu wurde eine bereits früher häufig praktizierte Methode angewandt, nämlich durch die Entfernung eines Organs indirekt auf seine Funktion zu schließen. Es zeigte sich, daß die Splenektomie im Vergleich zur Scheinoperation zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeiten der Tiere führte, wenn sie wenige Stunden vor der Tumorzellinokulation und an den darauffolgenden drei Tagen durchgeführt wurde (Abb. 47 und 48). Hieraus ist zu schließen, daß die Milz während des genannten Zeitraums für die Ausbildung von tumorprotektiven Mechanismen notwendig ist, die entweder in ihr selbst oder im restlichen lymphoretikulären Gewebe (Lymphknoten, Knochenmark) zu lokalisieren sind. Die Milz könnte also das Tumorzustum selbst direkt oder über das extrasplenische lymphatische Gewebe indirekt fördern. Später verliert die Milz ihre tumorprotektive Funktion. Dies könnte auf dem Verschwinden der tumorschützenden Mechanismen aus der Milz oder auf dem Überwiegen dieser Mechanismen im restlichen lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Knochenmark) beruhen. Verständlicherweise würde dann die Splenektomie nur mehr zu einer geringeren Hemmung des Tumorzustums führen. Fragt man sich nach der Natur der splenogenen Tumorzustumprotektion, so hilft die Beobachtung weiter, daß die Tumorförderung nur solange durch Splenektomie zu verringern ist, wie die Milz ein lymphatisches Organ darstellt. Mit zunehmender Etablierung der Granulopoese auf Kosten der Milzlymphozyten (Abb. 49), also mit zunehmender Umwandlung der Milz in ein vorwiegend myelopoetisches Organ, verliert sie ihren tumorprotektiven Einfluß. Da

die Entwicklung der tumorschützenden Mechanismen offensichtlich an die Anwesenheit lymphatischen Gewebes in der Milz gebunden ist, scheinen sie immunologischer Natur zu sein.

Unsere Ergebnisse lassen zusammengefaßt über die Rolle der Milz beim LL-Tumorstadium die Schlußfolgerung zu, daß die Milz innerhalb weniger Tage nach der Tumorzellinokulation, für die Ausbildung in ihr oder in den peripheren lymphatischen Organen lokalisierter Mechanismen entscheidend ist, die das Tumorstadium auf immunologische Weise fördern. Gut in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen stehen die Befunde der in Tab. 19 aufgeführten Arbeiten.

Tab. 19: Wirkung (Wkg.) der Splenektomie (Sx) auf den Primärtumor (Tu) und auf die Lungenmetastasierung (Lm) in verschiedenen Tumor-Wirt-Systemen

Tumor	Wirt	t(Sx) (d)	Wkg. auf Tu Lm	Lit.
S - 180	Swiss Ha/ICR	-21;-13;-6;	-	(126)
S - 180	Balb/c; AKR; A; Rockland 3; R6; R3/5;	-7;	-	(147)
S - 180	Swiss Ha/ICR	-14;	-	(57)
MCA induz. Tu	C3H/HeJ	0;+3/+6;+9;+12;	-/+	(195)
MCA induz. Ascites Ca.	Balb/c	-14;	-	(31)
Ehrlich Ascites Ca.	DDS	-7;+5/+10;	-/+	(95)
Moloney-Sarkoma-Virus induz. Sarkom	Balb/c	-1;	-	(130)
Ward Colona.	Fisher Rat	-21;	-	(113)
MCA induz. Sarkom	C57/B1; B10.P1	-21;/-7;	-/+	(123)
spontanes Lymphom	AKR	-14;	-	(34)
Cloudman Melanom S91		+1; hohe-/kl.Tud. kleiner Tumor	-/+	(122)
3 LL-Sarkom	C 57/81		-	(141)
MCA induz. Fibrosarkom	C 57/81	-21;	-	(116)
MCA induz. Sarkom	DBA/2J	-21;	±	(190)
MCA induz. Fibrosarkom	C3H/HeN	-8;-1;	±	(10)
Lymphom	MHA-Hamster	-7;	+	(68)

t(Sx): Zeit der Splenektomie (-) vor und (+) nach der Tumorzellinokulation in Tagen (d)

- : Hemmung + : Beschleunigung des Tumorstadiums

± : kein Effekt

Danach bewirkt die Splenektomie bei chemisch oder viral induzierten, syngen oder allogenen transplantierten Tumoren eine Hemmung des Tumorwachstums. In den meisten Fällen wurde die wachstumsverzögernde Wirkung der Splenektomie für ihre Durchführung vor der Inokulation der Tumoren festgestellt. Aber auch nach Tumorinokulation bewirkt die Entfernung der Milz eine Wachstumsverzögerung. Allerdings wurde in anderen Arbeiten keine Veränderung bzw. sogar eine Beschleunigung des Tumorwachstums nach Splenektomie beobachtet. Die Milz spielt daher eine Doppelrolle. Einerseits vermag sie die Entwicklung von Tumoren zu hemmen und andererseits ist sie an der Ausbildung tumorprotektiver Mechanismen beteiligt. Es ist anzunehmen, daß in der Milz tumorwachstumsfördernde und -hemmende Mechanismen gleichzeitig nebeneinander vorliegen können. Wegen der Dynamik des Verhältnisses der fördernden zu den hemmenden Kräften in der Milz ist beim Vergleich der unterschiedlichen Auswirkungen der Splenektomie auf das Tumorwachstum der Tumorinokulation zu Splenektomie Zeitabstand wichtig (95, 123, 195). Auch die inokulierte Tumorzellzahl ist zu berücksichtigen (31, 116, 122). Unterschiede in der Histokompatibilität zwischen Wirt und Tumor stellen eine weitere Ursache für die nach Splenektomie in den einzelnen Versuchen beobachteten unterschiedlichen Regressions- bzw. Progressionstendenzen der Tumoren dar (22, 57, 117, 147). Besondere Aufmerksamkeit verdient nochmals der Umstand, daß eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum durch die Splenektomie insbesondere dann gegeben ist, wenn die Milz vor der Tumorinokulation bzw. im frühen Tumorstadium entfernt wird (Tab. 19). Dies unterstreicht die Rolle der Milz bei der Entwicklung der Tumorprotektion in der Frühphase nach der Tumortransplantation. Einer der Gründe hierfür mag die besondere anatomische Situation sein, die die Milz von allen lymphatischen Organen am schnellsten und am stärksten auf die Antigene im Blut reagieren läßt (1 , 146). Warum die Milzent-

fernung im fortgeschrittenem Tumorstadium meistens ohne Erfolg bleibt, lassen u. a. Rowleys (146) Befunde verstehen. Er konnte nach intravenöser Verabreichung wachsender Antigen-dosen einen zunehmenden Beitrag des extrasplenischen lymphatischen Gewebes an der Immunantwort aufzeigen, während der Beitrag der Milz im Sinne einer Sättigung trotz weiterer Steigerung der Antigenmengen, unverändert blieb. Diese Situation mag mit der Antigenezufuhr in das Blut im fortgeschrittenem Tumorwachstums vergleichbar sein. Denkbar wäre, daß hierbei die Tumorantigenezufuhr an das extrasplenische Gewebe ausreichend groß ist, um dort tumorwachstumsfördernde Mechanismen in Gang zu setzen. Die Schrittmacherrolle der Milz bei der Ausbildung von tumorprotektiven Mechanismen in der Frühphase des Tumorwachstums hätte also nicht ihre Begründung in einer besonderen immunologischen Reaktionsfähigkeit der Milz, sondern in ihrer ungewöhnlichen anatomischen Situation, die ihr als erste unter den lymphatischen Organen die Reaktion auf Tumorantigene im Blut ermöglicht. Tatsächlich kann das Tumorenancement auch in Abwesenheit der Milz ausgelöst werden (147). Auch scheint die Milz in Situationen, in denen die regionalen Lymphknoten als erste mit Tumorantigenen Kontakt aufnehmen keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. So hat die Milz keinen Einfluß auf die Inzidenz spontaner Tumoren (31) und chemisch induzierter Tumoren (2, 31), während sie entscheidenden Einfluß auf transplantable Tumoren hat, bei denen es technisch bedingt, früh nach Tumordinokulation zu einem Antigenanstieg im Blut kommt (15). Aber sicherlich ist es zu einfach, die besondere Rolle der Milz beim Tumorenancement nur aus ihrer anatomischen Situation abzuleiten.

5.3.2. Wie schützt die Milz das (LL-)Tumorstadium?

Schon sehr früh wird in der Literatur über Versuche berichtet, Tiere vor Tumortransplantaten durch Immunisierung mit abgetöteten Tumorzellen zu schützen. Wohl den ersten Versuch dieser Art haben Flexner und Jobling 1907 durchgeführt. Einige Tage vor der Transplantation von Jensen-Sarcom-Tumoren auf Ratten inokulierten sie den Tieren lebensunfähige Tumorzellen. Anstelle der zu erwartenden Tumoregression wuchsen die transplantierten Tumoren stark beschleunigt. Casey war der erste, der 1932 für dieses Phänomen den Begriff "enhancement" einführte. Er glaubte, daß das Enhancement von Malignomen durch einen Faktor "XYZ" im Tumorgewebe verursacht würde. Er zeigte am Brown-Pearce-Tumor des Kaninchens und für zwei weitere transplantable Mäusetumoren die Tumorspezifität des Enhancement. Durch die Arbeiten von Kaliss dürfte es als bewiesen gelten, daß das immunologische Enhancement durch Antikörper hervorgerufen wird (83). Diese Antikörper gehören bevorzugt der IgG-Klasse an. Tumorantigene und Immunkomplexe werden als weitere Verursacher des Immunologischen Enhancement beschrieben. Über die Art der Antigene gegen die die Bildung von Enhancing-Antibodies erfolgen kann, über die Bildungs kinetik dieser Antikörper, über ihre biologischen und physikochemischen Eigenschaften und über ihre Wirkungsweise (afferente, zentrale efferente Blockade der Immunantwort) berichten ausgezeichnete Übersichtsarbeiten (54, 75, 85, 184).

Die Milz, die bei der Maus ca. 60 % des gesamten lymphoretikulären Gewebes enthält, hat wesentlichen Anteil an der Bildung von Antikörpern. Dies belegen Hämolytintiter, die nach intravenöser Immunisierung von Mäusen (1, 161) und Ratten (146) mit Schafer erythrozyten bei splenektomierten Tieren erniedrigt sind. Splenektomierte Tiere zeigen in der Primärantwort neben einer erniedrigten IgG-Bildung vor allem

reduzierte IgM-Titer. Hinsichtlich der Veränderungen der humoralen Sekundärantwort durch die Splenektomie liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (146).

Die Milz spielt bei der Antikörperbildung eine dominierende Rolle. Es liegt nahe, daß sie möglicherweise auch Enhancing-Antibodies produziert. Die nach Splenektomie zu beobachtende Verzögerung des Tumorstums ließe sich also auf eine verminderte Bildung von Enhancing-Antibodies zurückführen. Zahlreiche Arbeiten unterstützen diese Vorstellung (9, 55, 56, 74, 117, 131).

Prehn (131) induzierte immunolog. Enhancement von DBA/2-Sarkomen in Balb/c-Mäusen durch intravenöse Immunisierung der Balb/c-Mäuse mit Blut vor der Tumortransplantation. In splenektomierten Balb/c-Mäusen konnte auf diese Weise kein Tumorenancement erzeugt werden. Vielmehr waren die Tiere gegenüber den Tumoren resistenter. Ferrer (56) beobachtete, daß AKR-Mäuse das Sarkom 180, einen "nicht-stammspezifischen" bzw. histoinkompatiblen Tumor unbekannter Herkunft, in 80-90 % nach Inokulation abstoßen. Ein zweiter Tumor, der drei Wochen nach Abstoßung des Erstplantates übertragen wird, hat eine höhere Angehrate. Werden die Tiere eine Woche vor der Immunisierung mit dem ersten Tumortransplantat splenektomiert, dann ist die Abstoßungsrate des Zweittransplantates normal hoch. Die Splenektomie verhindert daher die Ausbildung tumorwachstumsfördernder Reaktionen während der Erstimmunisierung der Tiere. Weiterhin demonstrierte Ferrer (55), daß Enhancing-Faktoren durch Seren aus Mäusen, die drei Wochen alte S 180-Tumoren trugen auf normale Mäuse passiv übertragen werden können. Splenektomie der Spendertiere eine Woche vor der Tumordinokulation reduzierte die Enhancing-Faktoren in ihren Seren stark. Möller (117) demonstrierte eine parallele

Entwicklung zwischen hämagglutinierenden Antikörpern und dem Wachstum von MCA induzierten Sarkomen, die auf histoinkompatible Wirte transplantiert wurden. Hämagglutinierende Antikörper finden sich im Serum des tumortragenden Tieres. Sie sind gegen H-2-Antigene auf den Erythrozyten des inkompatiblen Tumorspendertieres gerichtet. Durch die Meßung von hämagglutinierenden Antikörpern sollen Enhancing-Antibodies erfaßt werden können. Werden die Versuchstiere 8 - 12 Tage vor der Tumorinokulation splenektomiert, so führte dies zu einer Verlangsamung des Tumorstwachstums und zu einer Abnahme der Titer an hämagglutinierenden Antikörpern. Hellström (74) inokulierte in Mäuse syngene MCA induzierte Sarkomzellen. 12 bis 14 Tage später prüfte er die Zytotoxizität von Zellen aus Lymphknoten gegenüber autochthonen Tumorzellen. Hierbei zeigte sich, daß Zellen mit tumorspezifischer Zytotoxizität in den Lymphknoten der tumortragenden Tiere vorhanden waren. Erstaunlicherweise konnte die Zytotoxizität durch Serum der tumortragenden Tiere vollständig blockiert werden. Diese blockierende Wirkung fehlte allerdings, wenn die Milz 12 Tage vor der Tumorinokulation entfernt worden war. Ähnliches finden Bansal und Sjögren (9).

Die bisher dargestellten Arbeiten zeigen, daß die Entfernung der Milz das Phänomen des Immunologischen Enhancement (56, 131) bzw. die zugrunde liegenden Faktoren (9, 117) direkt reduziert oder eliminiert. Weitere Untersuchungen belegen zwar die Hemmung des Tumorstwachstums durch die Entfernung der Milz, doch liefern sie nur indirekte Hinweise für die Bildung von Enhancing-Faktoren (32, 57, 67, 68, 73, 130, 195).

Das immunologische Enhancement von Tumoren ist ein Beispiel für die Blockade der Immunantwort durch die Produkte der

humoralen, B-Zellen vermittelten Immunreaktion. Es würde der funktionellen Zweiteilung des Immunapparates in ein B-Zell- und T-Zellsystem widersprechen, wenn eine Blockade der Immunantwort nicht auch durch Suppressor-T-Zellen verursacht werden könnte.

Für das LL-Tumorwachstum liegen Befunde vor, die am besten durch die Wirkung von Suppressorzellen erklärt werden. So beobachtet man eine Abnahme der humoralen und der zellulären Immunreaktivität während des Wachstums von LL-Tumoren (4, 30, 96, 108, 153, 178, 179, 180). Kurata und Micksche fanden in Mäusen, die zu verschiedenen Zeiten nach LL-Tumorzellinokulation mit Schafserythrozyten immunisiert wurden, eine zum Tumorstadium korrelierende Abnahme der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion und der Plaque bildenden Zellen in der Milz (96). Anaclerio (4) findet eine reduzierte Reaktivität von normalen Milzzellen gegenüber B- und T-Zellmitogenen, wenn normale Milzzellen mit Splenozyten aus LL-Tumoren tragenden Tieren gemischt werden. Ebenso konnte die Graft-versus-Host-Reaktion von Milzzellen aus normalen Tieren durch Beimischen von Milzzellen aus Tumorträgern unterdrückt werden. Milzzellen aus normalen Tieren hemmen das Tumorwachstum (179, 180). Milzzellen aus tumorentragenden Tieren unterdrücken die tumorhemmende Wirkung der normalen Milzzellen (178). Auch im Winnassay zeigen Milzzellen aus Tieren, die 10 Tage alte LL-Tumoren trugen, einen Enhancingeffekt (179). Ebenso wurde das Tumorwachstum durch Milzzellen beschleunigt, die LL tumortragenden Tieren 8, 16 Tage (153), 14 Tage (180), 19 - 26 Tage (178) und 28 Tage (108) nach Tumordinokulation entnommen wurden. Dieser Enhancingeffekt erwies sich zum Teil als LL-Tumor spezifisch (30, 180) und zum Teil als unspezifisch (178). Die in vivo Sensibilisierung mit LL-Tumoren führt also zur Bildung von immunsuppressiven und tumorprotektiven Milzzellen. Aber nicht nur in vivo, sondern auch in

vitro lassen sich Splenozyten an LL-Monolayerkulturen in Zellen verwandeln, die das Tumorstadium fördern (163).

In der Literatur herrscht überzeugende Übereinstimmung, daß T-Zellen beim Enhancement des Lewis Lung Sarkom die entscheidende Rolle spielen (30, 144, 178, 179, 180).

Treves (178, 179) konnte den Enhancingeffekt von Milzzellen aus tumortragenden Mäusen durch Behandlung mit Anti-Thy-Serum und Komplement beseitigen. Die Thymektomie, die normalerweise mit einer Erniedrigung zytotoxischer T-Zellen einhergeht und das Tumorstadium stimuliert, reduziert die Lungenmetastasierung des Lewis Lung Tumors, wenn sie zwei, fünf und 24 Wochen vor der Inokulation des Tumors an ausgewachsenen Tieren durchgeführt wird (179). Umiel und Trainin (180) bestätigen dies für die acht Wochen vor der LL-Tumordinokulation durchgeführte Thymektomie. Weiterhin fanden sie in thymektomierten und tödlich bestrahlten Mäusen, die mit Thymozyten rekonstituiert worden waren (T-Mäuse) eine ausgeprägtere Lungenmetastasierung als bei Mäusen, die mit Knochenmarkzellen (B-Mäuse) rekonstituiert worden waren. Das T-Zellen vermittelte Enhancement der LL-Tumoren beruht hierbei nicht auf der direkten Stimulation der Tumorzellen, sondern auf einer Hemmung der Antitumorimmunantwort. Treves (178, 179) konnte nämlich eine Förderung des Tumorstadiums durch Übertragung von Milzzellen aus tumortragenden Tieren nur in immunkompetenten Tieren und nicht in immunsupprimierten Empfängertieren hervorrufen. Neben der Thymektomie lassen sich die Suppressor-T-Zellen durch die Auslösung einer Graft-versus-Host-Reaktion im Tumorträger reduzieren (30). Auch in chimären Mäusen scheinen die Suppressor-T-Zellen vermindert zu sein (144).

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß Tiere nach Tumorinokulation um so länger leben, je weniger T-Zellen durch Splenektomie entfernt werden (Abb. 50). Dies steht in Widerspruch zu den aufgezeigten Suppressorfunktionen der T-Zellen. Der Gegensatz ist allerdings nur scheinbar.

Treves (178) konnte in der ersten Woche nach Tumorzellinokulation eine hemmende Wirkung von Milzzellen auf das Tumorstadium im Winnassay feststellen. Erst später entfalteten die Milzzellen einen Enhancingeffekt. Auch in vitro waren die Milzzellen gegenüber Tumorzellen zytotoxisch. T-Zellenelimination beseitigte die Zytotoxizität (179). Manor fand ebenfalls eine hemmende Wirkung von Milzzellen im Winnassay, die Tieren eine Woche nach Tumorinokulation entnommen wurden. Elimination der T-Zellen beseitigte gleichfalls die wirtprotektive Wirkung (108). Aber nicht nur in vivo, sondern auch in vitro können Milzzellen bzw. T-Zellen an LL-Monolayerkulturen zur Ausbildung von zytotoxischen Eigenschaften induziert werden. Treves und Cohen sensibilisierten Lymphozyten an LL-Zellkulturen, die in vivo zur Abstoßung von LL-Sarkomen führten (176). In vitro gegen LL-Tumorzellen sensibilisierte Milzzellen manifestieren ebenfalls Zytotoxizität in vitro (81).

Die Ergebnisse der Arbeiten (81, 108, 176, 178, 179) lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß es während des LL-Tumorstadiums sowohl zur Bildung von Suppressor- als auch von zytotoxischen T-Zellen kommt. Beide Zellarten können ebenfalls in vitro induziert werden. Während zu Beginn des Tumorstadiums die zytotoxischen T-Zellen die Suppressor-T-Zellen überwiegen, kehrt sich das Verhältnis mit fortschreitendem Tumorstadium zugunsten der Suppres-

sor-T-Zellen um (108). Unser Ergebnis, daß die Milz innerhalb der ersten sieben Tage nach Tumordinokulation T-Zellen mit vorwiegend tumorwachstumshemmenden Eigenschaften enthält, steht daher mit der Literatur gut in Einklang.

Später waren, trotz weitgehender Verdrängung des lymphatischen Gewebes durch die Granulopoese, wieder mehr T-Zellen in der Milz (Abb. 22 und 23). Entsprechend dem Schrifttum hätte man eine Hemmung des LL-Tumorwachstums durch die Splenektomie erwarten dürfen, da im fortgeschrittenen Tumorstadium gebildete T-Zellen vorwiegend Suppressorfunktion haben. Vermutlich bedürfen die T-Zellen, um ihre Funktion wirksam ausüben zu können, der Kooperation anderer Zellarten. Die Milz bietet unter normalen Verhältnissen aufgrund ihres Baues hierfür besonders günstige Voraussetzungen. Die Granulopoese könnte durch Störung der normalen mikroanatomischen Milzarchitektur den Verlust der optimalen Zellkooperationsmöglichkeiten verursachen.

5.3.3. Herkunft der beim LL-Tumorwachstum gebildeten T-Suppressorzellpopulationen

Es ist das Verdienst von Raff und Cantor (135) ein Modell der verschiedenen T-Zellpopulationen entworfen zu haben. Danach kann eine T_1 -Population von einer T_2 -Population unterschieden werden. Die T_1 -Population umfaßt unreife Thymozyten, die im Thymus und in der Milz vorkommen. Thymektomie führt rasch innerhalb von 2 - 3 Wochen zu einer erheblichen Abnahme der Zellen in der Milz. Kleine Dosen von Antilymphozytenserum oder Ductus thoracicus Drainage reduziert ihre Zahl nicht, da T_1 -Zellen keiner Blut-Lymph-Rezirkulation unterliegen. T_1 -Zellen sind radiosensibel. T_2 -Zellen haben Eigenschaften, die denen der peripheren T-Lymphozyten des Blutes sehr ähn-

lich sind. Die kleineren T₂-Zellen sind reifer und leben länger. Thymektomie wirkt sich erst nach mehr als 30 Wochen auf ihre Zahl aus. Sie wandern bevorzugt zu den Lymphknoten und finden sich reichlich im Pool der rezirkulierenden Lymphozyten des Blutes und des Ductus thoracicus. Durch Anti-lymphozytenserum und Ductus thoracicus Drainage können sie entfernt werden. Thymektomie führt kaum zu einer Reduktion der T₂-Population. Beiden T-Populationen ist das Thy-Antigen gemeinsam. An Hand der Expression weiterer Oberflächenantigene lassen sich beide T-Populationen zusätzlich differenzieren (T₁; H 2; MPLA). Die beiden T-Populationen sollen der gleichen T-Zelllinie angehören und verschiedene Zellreifestadien darstellen. Unreife T₁-Zellen reifen im Thymus oder in den peripheren Organen (Milz) insbesondere nach Antigenkontakt zu T₂-Zellen. Pierce und Kapp (129) berichten in ihrer Übersichtsarbeit über die Regulation der Immunantwort durch Suppressor-T-Zellen von Untersuchungen, die der T₁-Population unspezifische Suppressorfunktion zuschreiben. Nach Thymektomie erwachsener Mäuse zeigen Milzzellen eine erhöhte DNA-Syntheseantwort in der gemischten Lymphozytenreaktion, sowie erhöhte Zytotoxizität in vitro und verstärkte Antikörperproduktion gegenüber thymusunabhängigen Antigenen. Weitere Arbeiten zeigen, daß zur Milz wandernde Thymozyten die MLR-Antwort von Thymozyten die zu den Lymphozyten wandern supprimieren. Cantor und Weissmann (28) berichten, daß Thymektomie oder Bestrahlung die Con A induzierte Suppressoraktivität von Milzzellen hemmt. Auch während des LL-Tumorwachstums entwickeln sich in der Milz T-Zellpopulationen mit suppressiven und zytotoxischen Eigenschaften, die nebeneinander in einem mit dem Tumorwachstum variierenden Verhältnis vorliegen (Abs. 5.3.2.).

In Anbetracht des von Cantor (28, 135) vorgeschlagenen Modells zur Klassifikation von T-Zellen, liegt die Vermutung nahe, daß die in der Milz während des LL-Tumorstadiums vorhandenen Suppressor-T-Zellen sich aus der T_1 -Population rekrutieren und die zytotoxischen T-Zellen der T_2 -Population angehören (29, 162, 163).

Small und Trainin (163) konnten Milzzellen, die in vitro an LL-Monolayerkulturen sensibilisiert wurden, durch Geschwindigkeitssedimentation in zwei Fraktionen auftrennen. Eine schnell sedimentierende, große lymphoblastenartige Zellfraktion, die im Winnassay unspezifische Enhancingaktivität besaß und eine langsam sedimentierende, aus kleinen Lymphozyten bestehende Fraktion, die im Winnassay das Tumorstadium hemmen konnte. In die gleichen Fraktionen ließen sich an LL-Tumorzellen in vitro sensibilisierte Thymozyten trennen. Durch radioaktive Impulsmarkierung während der Sensibilisierungsphase zeigte sich, daß die Radioaktivität nach weiterer Inkubation der Zellen an LL-Monolayer in der Fraktion der kleinen, langsam sedimentierenden Thymozyten angestiegen war. Diese Ergebnisse sprechen gegen das Bestehen zweier getrennt vorliegender T-Populationen. Zusammen mit dem von Raff und Cantor vorgeschlagenen Modell sprechen sie vielmehr für das Vorliegen einer T-Zelllinie, deren unterschiedliche Zellreifstadien differente Funktionen zeigen. Small (162) untersuchte die Eigenschaften von Thymozyten aus zwei Wochen alten normalen C 57 Bl-Mäusen, die im Winnassay das LL-Tumorstadium förderten. Thymozyten mit Enhancingaktivität waren unreife, schnell proliferierende Zellen, die durch Behandlung mit BUdR und Licht beseitigt werden konnten. Nach Hydrocortisoninjektion kommt es rasch zu einer Zelldepletion des Thymus. Innerhalb von 24 Stunden erfolgt eine Regeneration durch rasch proliferierende Thymozyten. Diese unreifen Zellen

unreifen Zellen wirken im Winnassay auf das Tumorstadium stark fördernd. Umgekehrt hatten Thymozyten aus Tieren, die mit THF (Thymus Humoraler Faktor) behandelt wurden, einer aus Thymusgewebe gewonnenen hormonähnlichen Substanz, die die Reifung unreifer Thymozyten bewirkt, keinen Enhancingeffekt. Carnaud (29) konnte durch THF während der in vitro Sensibilisierung von Milzzellen an LL-Monolayern die T-Zellen vermittelte Zytotoxizität beträchtlich steigern. Bellelli (15), der das Auftreten von LL-Tumorantigenen im Blut, in der Milz und im Thymus nach Tumorinokulation untersuchte, kommt zu der Schlußfolgerung, daß Tumorantigene im Thymus zur Induktion von Suppressor-T-Zellen führen. Ähnlich konnte durch die Injektion von humanem Serumalbumin direkt in den Thymus eine Suppressor-T-Zellen vermittelte Toleranz gegen HSA erzeugt werden (158). Diese Befunde lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß die Suppressor-T-Zellen, die das Wachstum von Lewis Lung Tumoren fördern, der unreifen T₁-Population angehören. Aufgrund der Strahlenempfindlichkeit der T₁-Zellen wäre die Bestrahlung der Milz eine weitere immuntherapeutische Alternative. Im Vergleich zur Splenektomie hätte die Strahlentherapie den Vorteil der Wiederholbarkeit, wobei die Milz als ein Filter für die selektiv zu zerstörenden Zellpopulationen dienen könnte.

5.3.4. Ist das Enhancement der LL-Tumoren in der NRMI-Maus B - oder T-Zellen vermittelt?

Die bisher dargestellten Arbeiten zeigen klar, daß das Enhancement des Lewis Lung Sarkoms T-Zellen reguliert ist. In unserer Untersuchung konnten wir jedoch beobachten, daß Tiere nach Tumorinokulation um so länger lebten, je mehr B-Zellen durch Splenektomie entfernt wurden (Abb. 50). Dies spricht für ein B-Zellen vermitteltes, also humorales durch Antikörper hervorgerufenen Tumorenhanement. Dieser Wider-

spruch löst sich, wenn T-Zellen und B-Zellen eine Suppressor-kette bilden. So wäre es vorstellbar, daß B-Zellen für die Produktion von Enhancingantibodies der Hilfe von T-Zellen bedürfen. Tatsächlich gibt es Arbeiten, die diese Vorstellung unterstützen. Treves (177) berichtet über einen Enhancingfaktor im Überstand von in vitro kultivierten Milzzellen, die syngenen C57 Bl-Mäusen zwei bis drei Wochen nach der LL-Tumorinokulation entnommen worden waren. Dieser Faktor, der auch im Serum der Tiere nachzuweisen war, förderte das Wachstum von LL-Tumoren. Die Entfernung der B-Zellen und der Makrophagen von den in vitro kultivierten Milzzellen hatte keine Wirkung auf die Aktivität des Faktors, während die Elimination der T-Zellen die Bildung des Enhancingfaktors beseitigte. Isakov konnte zeigen, daß dieser Enhancingfaktor in Anwesenheit von Antigenen als polyklonaler B-Zellaktivator wirkt. In Anwesenheit von Antigen verstärkt er spezifisch die humorale Immunantwort auf das applizierte Antigen (82). Es erscheint daher die Annahme berechtigt, daß dieser Faktor auch die humorale Antwort auf LL-Tumorantigene verstärkt und damit die Bildung von Enhancingantibodies begünstigt. Die Zielzelle des Enhancingfaktor ist nicht die T-Helfer-Zelle, sondern direkt die B-Zelle, deren Aktivierung und Differenzierung zur Antikörper bildenden Zelle gefördert wird. In erneuten Untersuchungen gelangte Hollander (78) zu Ergebnissen, die Treves Befunden widersprechen. Nach Hollanders Ansicht würde der Enhancingfaktor von den LL-Tumorzellen selbst gebildet und an Milzzellen vor allem an B-Zellen und Makrophagen und weniger an T-Zellen adsorbiert und von diesen in Kultur gebrachten Zellen in den Überstand abgegeben. Andererseits konnte Manor (108) die Beobachtungen von Treves (177), daß der EF durch T-Zellen gebildet würde, in einem allogenen System (LL-Tumoren in C3H/eb-Mäusen) bestätigen.

Sowohl die von Treves (177) und Isakov (82) durchgeführten Untersuchungen, als auch die Befunde von Manor (108) sprechen dafür, daß B-Zellen bei der Produktion von Antikörpern (Enhancingantibodies?) durch T-Zellprodukte stimuliert werden, somit B- und T-Zellen beim LL-Tumorwachstum funktionell eine Suppressorkette bilden könnten.

Diese Vorstellung wird auch durch die Tatsache gestützt, daß Enhancingantibodies der IgG-Klasse angehören (83, 85). Die Antikörperbildung dieser Klasse ist bekanntlich T-Helferzellen abhängig. Sollte unsere Hypothese zutreffen, dann dürfte in der nackten Maus die Milz keine Rolle beim Tumorenancement spielen. Lersch (105) splenektomierte nackte Mäuse am Tag der LL-Tumorzellinokulation und während des Tumorwachstums in regelmäßigen Abständen. Zu keiner Zeit konnte durch die Splenektomie im Vergleich zur Scheinoperation eine Reduktion des Tumorwachstums, noch eine Verlängerung der Überlebenszeiten der Tiere erzielt werden. Schließlich soll erwähnt werden, daß wir kein syngenes, sondern ein allogenes Tumor-Wirt-System verwendet haben. Das ursprünglich in C57 Bl-Mäusen (H 2^b) chemisch induzierte LL-Sarkom wurde vor mehreren Jahren auf die NRMI-Mäuse adaptiert. Möller (117) fand, daß Tumoren nach Transplantation in histoinkompatible Wirte ihre H2-Oberflächenantigene reduzieren. Solche "nicht-stammspezifischen" Tumoren zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber zytotoxischen Antikörpern. Dies begünstigt die Ausbildung des immunologischen Enhancement. So konnte Möller in einem "nicht-stammspezifischen" Tumor-Wirt-System die Bildung von Enhancingantibodies nachweisen, die sich durch Splenektomie verringern ließ. Da auch wir unsere Untersuchungen an einem seit Jahren etablierten allogenen, nicht stammspezifischen Tumor-Wirt-System durchgeführt haben, stellt das Ergebnis, daß B-Zellen das Tumorenancement hervorrufen, eine gute Ergänzung zu Möllers Beobachtungen dar.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Mit Hilfe der Feinnadelaspirationsbiopsie an subkutan verlagerten Milzen Lewis-Lung-Tumoren-tragender NRMI-Mäuse kann unsere 1. Teilfrage wie folgt beantwortet werden:

- a) Die Lymphozytenzahl nimmt 2 bis 4 Tage nach der Tumoringokulation auf die Hälfte des Normalen ab. Am 6. bis 8. Tag kehrt sie zu den Ausgangswerten zurück. Nach erneutem Abfall folgt ein zweiter Anstieg auf subnormale Werte am 19. bis 20. Tag, dem sich eine endgültige Reduktion der Lymphozytenzahl auf 1/3 bis 1/4 des Normalen anschließt. Bis zum 10. bis 12. Tag verändert sich die T-Zellpopulation parallel zur Gesamtlymphozytenzahl, während die Zahl der B-Zellen konstant bleibt.
- b) Die polymorphkernigen Granulozyten erreichen am 19. bis 24. Tag ein gegenüber den Ausgangswerten um 40 bis 50fach höher gelegenes Maximum. Danach fällt ihre Zahl, während die granulopoetischen Zellformen des Poliferationspools und des Reifungspools kontinuierlich bis auf das 20 bis 30fache des Normalen ansteigen und die Polymorphkernigen zahlenmäßig im Sinne einer Linksverschiebung überwiegen.
- c) Die Veränderungen der granulopoetischen Zellformen stehen in enger Beziehung zum Tumorstadium. Eine Linksverschiebung (Lv) erfolgt unter den granulopoetischen Zellformen um so früher, je größer die durchschnittliche Tumorstadiumsgeschwindigkeit ($\bar{V}$) ist.
 $t(Lv) - (\bar{V}) : r = -0,651; n = 19; p < 0,001$
- d) Die subkutane Applikation von tiefgefrorenen LL-Tumorzellen in einer zum Zellzerfall des natürlichen Tumorstadiums annähernd äquivalenten Dosierung verursacht im

Vergleich zum Tumorwachstum eine nur schwache Vermehrung granulopoetischer Zellformen in der Milz.

- e) Die zymosaninduzierte, luminolverstärkte Chemilumineszenzaktivität der granulopoetischen Zellformen zeigt einen biphasischen Verlauf mit Maxima um den 6. bis 10. Tag und um den 17. bis 19. Tag.
- f) Die erythropoetischen Zellformen steigen gegen Versuchsende auf das Zweifache des Normalen an.

Schlußfolgerungen:

- a) Befunde im Schrifttum, wie die abnehmende humorale und zelluläre Immunreaktivität von Milzzellen während des LL-Tumorwachstum lassen sich zum Teil durch die Reduktion immunkompetenter Lymphozyten erklären.
- b) Das LL-Sarkom ist ein granulopoeseinduzierender Tumor.
- c) Die gute Korrelation zwischen den Zeiten der Lv und den durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumoren spricht für die Bildung von granulopoeseestimulierenden Faktoren (z. B. CSF_g) in den Tumorzellen.
- d) Eine unspezifische granulopoetische Reaktion der Milz wird durch die Tumorphomogenatinokulationsversuche ausgeschlossen.

Unsere 2. Teilfrage kann anhand der Auswirkungen der Splenektomie und der Scheinoperation auf die Überlebenszeit der LL-Tumoren tragenden Tiere und anhand der Beziehungen zwischen den Milzzellveränderungen und dem Tumorwachstum wie folgt beantwortet werden:

- a) Die am Tag der Tumorinokulation und an den darauffolgenden nächsten 3 Tagen durchgeführte Splenektomie steigert die Überlebenszeit gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant um 10 Tage ($p < 0,001$).
- b) Der lebensverlängernde Effekt der Milzentfernung verschwindet mit Abnahme der Lymphozytenzahl in der Milz.
- c) Je höher das B- zu T-Zellenverhältnis in den entfernten Milzen ist, desto größer ist die Überlebenszeit der Tiere.
 $\bar{ÜZ} - B/T : r = 0,64; n = 21; p < 0,001$
- d) Die Korrelationsanalyse zwischen den Veränderungen der Milzzellen und des Tumorwachstums zeigt:
 Je früher nach Tumorinokulation ein Anstieg der Polymorphkernigen ($t \uparrow (PMN)$) und eine Linksverschiebung ($t (Lv)$) unter den granulopoetischen Zellformen in der Milz erfolgt, desto schneller tritt eine Verzögerung des Tumorwachstums ein ($t(\bar{K}_{Max1})$).

$$t(\bar{K}_{Max1}) - t(PMN) : r = 0,488; n = 19; p < 0,05$$

$$t(\bar{K}_{Max1}) - t(Lv) : r = 0,618; n = 19; p < 0,001$$

Schlußfolgerungen:

- a) Die Milz fördert in der Frühphase das LL-Tumorwachstum.
- b) Die Tumorprotektion beruht auf immunologischen Mechanismen.
- c) Milz-B-Lymphozyten fördern und Milz-T-Lymphozyten hemmen das frühe LL-Tumorwachstum.
- d) Polymorphkernige könnten LL-Tumorzellen zerstören.
Welche Bedeutung den Chemilumineszenzaktivitätsveränderungen hierbei zukommt bleibt in Zytotoxizitätstests zu überprüfen.

7. Zusammenfassung

Stellt die Splenektomie eine wirksame immuntherapeutische Maßnahme beim Tumorwachstum dar? Mit der Bejahung dieser Frage wäre die Vorstellung verbunden, daß sich in der Milz während des Tumorwachstums immunsuppressive Mechanismen etablieren.

Im ersten Teil unserer Arbeit wurden daher die zellulären Veränderungen in der Milz nach der Lewis-Lung-Tumorinokulation untersucht. Hierzu wurde bei NRMI-Mäusen die Milz ca. drei bis vier Wochen vor der Tumorinokulation unter Erhaltung ihres Gefäßstieles subkutan verlagert, so daß Milzzellen durch Feinnadelpunktion täglich entnommen werden konnten. Die licht- und immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung gab Aufschluß über die qualitativen Veränderungen der verschiedenen Milzzellarten und ihrer Subpopulationen während des Tumorwachstums. Nach Bestimmung des in-vivo-Gewichtes der subkutan verlagerten Milzen mittels einer Eichgeraden und der Milzzelldichte in den Milzgewebeproben konnten die bisher nur qualitativen Veränderungen der Zellpopulationen erstmals für die Feinnadelaspirationsbiopsietechnik auch quantifiziert werden. Nach der LL-Tumorinokulation trat eine bis zu 40fache Zunahme der granulopoetischen Zellformen in der Milz auf. Die Granulopoese verdrängte die Lymphozyten und bewirkte zusammen mit dem Anstieg der erythropoetischen Zellformen auf das Einundeinhalbfache des Normalen, die während des Tumorwachstums zu beobachtende Vergrößerung der Milz um das zwei- bis dreifache. Durch die subkutane Applikation von tiefgefrorenen Tumorzellhomogenaten konnte eine unspezifische Reaktion des hämatopoetischen Gewebes der Milz nach antigener Stimulation als Ursache der Granulopoese ausgeschlossen werden. Aufgrund der guten Korrelation der durchschnittlichen Tumorwachstumsgeschwindigkeiten zu den Zeiten der Linksverschiebung unter den granulopoetischen Zellformen scheint die Bildung von CSF

in den Tumorzellen wahrscheinlich. Die Validität des Untersuchungsmodells wurde durch Vergleich der an subkutan verlagerten und an intraabdominal gelegenen Milzen beobachteten Zellveränderungen aufgezeigt. In beiden Gruppen vollzogen sich die Zellfluktuationen nach der LL-Inokulation in gleicher Weise bezüglich Art und zeitlicher Reihenfolge. Die Feinnadelaspirationsbiopsie an subkutan verlagerten Milzen erlaubt somit, qualitativ und quantitativ die verschiedenen Milzzellpopulationen während des Tumorwachstums individuell für das einzelne Versuchstier mit guter zeitlicher Auflösung zu analysieren. Darüberhinaus war es durch diese Technik möglich, 95,8 % an Versuchstieren einzusparen.

Im zweiten Teil unserer Arbeit sollte geklärt werden, wie diese tumorinduzierten Milzzellveränderungen umgekehrt das Tumorwachstum beeinflussen. Durch die Auswirkungen der Splenektomie und der Scheinoperation auf die Überlebenszeiten von LL-Tumoren tragenden Tieren wurde gezeigt, daß die Milz innerhalb der ersten 3 Tage nach der LL-Sarkominokulation tumorprotektiv wirkt. Mit Auftreten der Granulopoese in der Milz, also mit Reduktion der Lymphozyten verschwindet der überlebenszeitverlängernde Splenektomieeffekt. Dies spricht für eine immunologische Tumorprotektion. Insbesondere scheinen B-Zellen für das LL-Tumorenhancement von Bedeutung zu sein, da tumortragende Tiere umso länger nach Splenektomie lebten, je höher das B- zu T-Zellverhältnis in den entfernten Milzen war. Für eine Hemmwirkung der Granulozyten auf die LL-Tumoren spricht, daß sich die Tumorentwicklung um so früher verzögerte, je schneller der Anstieg Polymorphkerniger und je eher eine Linksverschiebung unter den granulopoetischen Zellformen in der Milz erfolgte. Die Messungen der zymosaninduzierten und luminolverstärkten Chemilumineszenz zeigten, daß die Fähigkeit der Granulozyten, für Tumorzellen potentiell toxische, aktivierte O₂-Spezies zu bilden, um das 3 bis 5fache anstieg.

8. Bisher veröffentlichte Teilaspekte vorliegender Arbeit

1. C. Lersch, C. Hammer, M. Thiel, W. Brendel
Fine needle aspiration cytology of the spleen of tumor bearing mice.
J. Immunol. Methods 66: 307 - 312 (1984)
2. C. Lersch, C. Hammer, M. Thiel and W. Brendel
Fluctuations of splenic immune cells in mice during tumor growth: In vivo monitoring by fine needle aspiration cytology
Chirurg. Forum 1984, 265 - 267, Springer, Berlin, Heidelberg (1984)
3. C. Lersch, C. Hammer, M. Thiel, W. Brendel, F. Krombach, J. Meyer
Monitoring of spleen-cell-traffic in tumor-bearing mice by fine needle aspiration cytology
J. Expl. Clin. Cancer Res. 3: 2 - 5 (1984)
4. C. Lersch, M. Thiel, C. Hammer, P. Lenz, W. Brendel
Therapeutic value of splenectomy in mice at different intervals of time after 3 LL-Tumorinoculation
XIX. Congress of Eur. Soc. Surg. Res.
5. C. Lersch, M. Thiel, C. Hammer, F. Krombach, W. Brendel
Serial evaluation of absolute spleen cell numbers in Lewis Lung Tumor-bearing mice
Cancer Invest. 3: 535 - 539 (1985)

6. C. Lersch, M. Thiel, C. Hammer, M. Schunke, F. Krombach, W. Brendel
Splenic fine needle aspiration cytology in small animals with transplanted tumors
Transplant. Proc. 17: 2132 - 2133 (1985)
7. M. Thiel, C. Lersch, C. Hammer, F. Krombach, F. Schödel, P. Lenz, W. Brendel
Chemiluminescence (CL) and morphology of spleen cells in tumor-bearing mice
Chirurg. Forum 1985, 85 - 88, Springer, Berlin, Heidelberg (1985)

9. Literaturverzeichnis

1. Adler F. L.
Studies on mouse antibodies I. The response to sheep red cells.
J. Immunol. 95: 26 - 38 (1965)
2. Akamatsu Y.
Neoplasms in strains of splenectomized mice after a single 7, 12 dimethylbenz (alpha)anthracene treatment.
JNCI 55: 893 - 897 (1975)
3. Allen R. C., Stjernhom R. L., Steele R. H.
Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 679 - 684 (1972)
4. Anaclerio A., Moras M. L., Gonti G., Mistrello G., Spereafico
Suppression of mitogen responses and graft versus host reaction by splenocytes from mice bearing Lewis Lung carcinoma.
JNCI 61: 471 - 475 (1978)
5. Asano S., Urabe A., Okabe T., Sato N., Kondo Y., Ueyama A., Chiba S., Ohsawa N., Kosaka K.
Demonstration of granulopoietic factor(s) in the plasma of nude mice transplanted with a human lung cancer and in the tumor tissue.
Blood 49: 845 - 852 (1977)
6. Baserga R.
The relationship of the cell cycle to tumour growth and control of cell division: a review
Cancer Res. 25: 581 - 595 (1965)
7. Balducci L., Hardy C.
Concentration of hematopoietic precursors in Lewis Lung carcinoma bearing mice.
Expl. Hematol. (Copenh.) 10: 104 (1982)
8. Balducci L., Hardy C.
High proliferation of granulocyte-macrophage progenitors in tumor-bearing mice.
Cancer Res. 43: 4643 - 4647 (1983)

9. Bansal S. C., Sjögren H. O.
Counteraction of the blocking of cell-mediated tumor immunity by inoculation of unblocking sera and splenectomy : immunotherapeutic effects on primary polyoma tumors in rats.
Int. J. Cancer 9: 490 - 509 (1972)
10. Bard D. S., Pilch Y. H.
The role of the spleen in the immunity to a chemically induced sarcoma in C3H mice.
Cancer Res. 29: 1125 - 1131 (1969)
11. Bateman J. C.
Leukemoid reactions to transplanted mouse tumors.
JNCI 11: 671 - 687 (1951)
12. Baxter M. A., Leslie R. G. Q., Reeves W. G.
The stimulation of superoxide anion production in guinea pig peritoneal macrophages and neutrophils by phorbol myristate acetate, opsonized zymosan and IgG 2- containing soluble immune complexes
Immunology 48: 657 - 665 (1983)
13. Begemann H.
Praktische Hämatologie
Thieme Verlag (1982)
14. Begemann H.
Klinische Hämatologie
Thieme Verlag (1986)
15. Bellelli L., Sezzi M. L., Tirabassi A., Ippoliti F.
Immunogenicity of Lewis Lung carcinoma in C 57 B1/6 mice. Tumor-associated antigen(s) in peripheral blood, thymus and spleen of tumor-bearing mice.
Tumori 68: 373 - 380 (1982)
16. Berman J. E., Zolla-Pazner S.
Changes in splenic histology and cytology in mice bearing plasmocytomas
Cell. Immunol. 87: 137 - 146 (1984)
17. Bessho M., Hirashima K., Ando K. K., Nara N., Momoi H.
Hematopoietic stem cell kinetics in mice bearing CSF-producing fibrosarcoma.
Acta Hematol. Jpn. 47: 21 -33 (1984)

18. Blum L.
Evidence for immunologic specificity of the properidin system: demonstration, isolation and properties of a serum factor which interacts with zymosan and other polysaccharides at 0°C.
J. Immunol. 92: 61 - 72 (1964)
19. Boehringer, Mannheim
Bioluminescence, Chemiluminescence in : Methods of Bioluminescence Analysis
Boehringer, Mannheim, O. J., O. A.
20. Boggs D. R., Malloy E., Boggs S. S., Chervenick P. A., Lee R. E.
Kinetic studies of a tumor-induced leukemoid reaction in mice.
J. Lab. Clin. Med. 89: 80 - 92 (1977)
21. Borregaard N., Kragballe K.
Role of oxygen in antibody-dependent cytotoxicity mediated by monocytes and neutrophils.
J. Clin. Invest. 66: 676 - 683 (1980)
22. Bradner W. T., Pindell M. H.
Strain specificity of stimulated regression of sarcoma 180.
Cancer Res. 25: 859 - 864 (1965)
23. Brüda B. E.
Über die Beziehungen der Milz zum Tumorstadium
MMW 76: 1671 - 1672 (1929)
24. Budzynski W.
Lewis Lung carcinoma in mice as an experimental therapy model. I. The growth kinetics and the effect of tumor on host.
Arch. Immunologiae et. Therapiae Experimentalis 30: 363 - 372 (1982)
25. Buessow S. C., Paul R. D., Lopez D. M.
Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice.
JNCI 73: 249 - 255 (1984)
26. Burlington H., Cronkite E. P., Heldman B., Pappas N., Shadduck R. K.
Tumor-induced granulopoiesis unrelated to colony-stimulating factor.
Blood 62: 693 - 696 (1983)

27. Cantor H., Boyse E. A.
Functional subclasses of T lymphocytes bearing different
Ly antigens
J. Exp. Med. I 141: 1376 - 1389, II 141: 1390 - 1401
(1975)
28. Cantor H., Weissman I.
Development and function of subpopulations of thymocytes
and T lymphocytes.
Progr. Allergy 20: 1- 50 (1976)
29. Carnaud C., Ilfeld D., Brook I., Trainin N.
Increased reactivity of mouse spleen cells sensitized in
vitro against syngeneic tumor cells in the presence of a
thymic humoral factor.
J. Exp. Med. 138: 1521 - 1532 (1973)
30. Carnaud C., Markowicz O., Trainin N.
The influence of a graft-versus-host reaction on the
incidence of metastases after tumor transplantation.
Cell. Immunol. 14: 87 - 97 (1974)
31. Chang R. W., Turk J. L.
Increased resistance in splenectomized mice to a methyl-
cholanthrene - induced tumour.
Br. J. Cancer 35: 768 - 776 (1977)
32. Chandradasa K. D.
The development and specific suppression of concomitant
immunity in two syngeneic tumour-host systems.
Int. J. Cancer 11: 648 - 662 (1973)
33. Chatterjee B. N., Criuckshank E. W. H.
A comparative histological study of the spleen of va-
rious vertebrates with reference to the bone marrow and
the blood.
Indian J. Med. Res 16: 870 - 886 (1928)
34. Check J. H., Brady L. W., Leipold P. L., O'Neill E. A.
Protection against transplanted and spontaneous lymphoma
by inoculation of heat-altered syngeneic tumor cells in
splenectomized mice.
Cancer 34: 197 - 203 (1974)
35. Cheson B. D., Christensen R. L., Sperling R., Kohler B.
E., Babior B. M.
The origin of the chemiluminescence of phagocytosing
granulocytes.
J. Clin. Invest. 58: 789 - 796 (1976)

36. Cheung K., Archibald A. C., Robinson M. F.
The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan.
J. Immunol. 130: 2324 - 2329 (1983)
37. Clark R. A., Klebanoff S. J.
Neutrophil mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system.
J. Exp. Med. 141: 1442 - 1447 (1975)
38. Clark R. A., Klebanoff S. J.
Studies on the mechanism of antibody-dependent polymorphonuclear leukocyte mediated cytotoxicity.
J. Immunol. 119: 1413 - 1418 (1977)
39. Clark R. A., Klebanoff S.
Role of the myeloperoxidase-H₂O₂-halide system in concanavalin A induced tumor cell killing by human neutrophils.
J. Immunol. 122: 2605 - 2610 (1979)
40. Clark R. A., Olsson I., Klebanoff S. J.
Cytotoxicity for tumor cells of cationic protein from human neutrophil granules.
J. Cell. Biol. 70: 719 (1976)
41. Clark R. A., Szot S.
The myeloperoxidase - hydrogen peroxide - halide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity.
J. Immunol. 126: 1295 - 1301 (1981)
42. Czop J. K., Fearon D. T., Austen K. F.
Opsonin-independent phagocytosis of activators of the alternative complement pathway by human monocytes.
J. Immunol. 120: 1132 - 1138 (1978)
43. Dallegrì F., Frumento G., Minervini F., Muttini P., Patrone F.
Role of the oxidative metabolic burst in the antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by neutrophil polymorphonuclears.
Exp. Hematol. 10: 859 - 866 (1982)
44. Delmonte L., Liebelt R. A.
Granulocytosis - promoting extract of mouse tumor tissue partial purification.
Science 148: 521 - 523 (1965)

45. Delmonte L., Liebelt R. A.
Species and strain dependence of the reaction to a granulocytosis promoting factor (GPF) extracted from a mouse tumor.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121: 1231 - 1235 (1966)
46. Delmonte L., Liebelt A. G., Liebelt R. A.
Granulopoiesis and thrombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer.
Cancer Res. 26: 149 - 159 (1966)
47. De Wys W. D.
Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastasis and providing evidence for tumor - related systemic growth - retarding factor.
Cancer Res. 32: 374 - 379 (1972)
48. Doll J. N., Wilson M. R., Salvaggio J. E.
Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence for detection of immune complexes in human sera.
J. Clin. Invest. 66: 457 - 464 (1980)
49. Dore C. F., Balfour B. M.
A device for preparing cell spreads
Immunol. 9: 403 - 405 (1965)
50. Dorizzi M., Ortiz-Muniz G., Lopez D. M.
Increase in the proportion of cells with the C 3 receptor in Balb/c mice bearing mammary tumors.
Int. J. Cancer 16: 1015 - 1021 (1975)
51. Ebbenhorst-Tengbergen W. J. P. R. van., Mühlbock O.
Disorders of the blood of mice bearing spontaneous or transplanted tumor.
Br. J. Cancer 12: 81 - 97 (1958)
52. Egwang T. B., Gauldie J., Befus A. D.
Lack of specificity of the C3 - opsonized zymosan reagent for the assay of membrane complement receptors.
J. Immunol. Methods 61: 253 - 257 (1983)
53. Fahey R. J.
Unusual leukocyte response in primary carcinoma of the lung.
Cancer 4: 930 - 935 (1951)
54. Feldman J. D.
Immunological enhancement: a study of blocking antibodies.
Adv. Immunol. 15: 167 - 214 (1972)

55. Ferrer J. F.
Role of the spleen in passive immunological enhancement.
Transplantation 6: 167 - 172 (1968)
56. Ferrer J. F.
Enhancement of the growth of sarcoma 180 in splenecto-
mized and sham-operated AKR mice.
Transplantation 6: 160 - 166 (1968)
57. Ferrer J. F., Mihich E.
Effect of splenectomy on the regression of transplan-
table tumors.
Cancer Res. 28: 1116 - 1120 (1968)
58. Ford W. L.
The recruitment of recirculating lymphocytes in the
antigenically stimulated spleen.
Clin. Expl. Immunol. 12: 243 - 254 (1972)
59. Ford W. L.
Lymphocyte migration and immune response.
Prog. Allergy 19: 1- 59 (1975)
60. Ford W. L., Gowans J. L.
The traffic of lymphocytes.
Seminars Haemat. 6: 67 - 83 (1969)
61. Friedrich A., Walther E., Bomski B., Glass W.
Simultane Untersuchungen der Granulozytenphagozytose,
Serumimmunglobuline, akute Phase-Proteine und der drit-
ten Komplementkomponente bei Patienten mit malignen
Tumoren.
Arch. Geschwulstforsch. 54: 137 - 152 (1984)
62. Fulop G. M., Osmond D. G.
Regulation of bone marrow lymphocyte production. III.
Increased production of B- and Non-B-lymphocytes after
administering systemic antigens.
Cell. Immunology 75: 80 - 90 (1983)
63. Gale R. P., Zighelboim J.
Polymorphonuclear leukocytes in antibody-dependent
cellular cytotoxicity.
J. Immunol. 114: 1047 - 1051 (1977)
64. Galli S. J., Dvorak H. F., Churchill W. H., Hammond M.
E., Connell A. B., Galli A. S., Dvorak A. M.
Basophil-tumor cell interactions in vitro.
Fed. Proc. 36: 1324, Nr. 5589 (1977)

65. Garnis S., Lala P. K.
Surface markers of small lymphocytes appearing in the mouse Ehrlich ascites tumor, host spleen and blood.
Immunology 34: 487 - 499 (1978)
66. Geran R. I., Greenberg N. H., Mac Donald M. M., Schumacher A. M., Abbott B. J.
Protocols for screening chemical agents and natural products against tumors and other biological systems.
Cancer Chemother. Rep. Part III No. 1 (1972)
67. Gershon R. K., Carter R. L.
Factors controlling concomitant immunity in tumor-bearing hamsters: effects of prior splenectomy and tumor removal.
JNCI 43: 533 - 543 (1969)
68. Gershon R. K., Kondo K.
Mechanism by which the spleen may act in regulating tumor immunity after tumor resection.
JNCI 43: 545 - 551 (1969)
69. Goldstein I. M., Roos D., Kaplan H. B., Weissmann G.
Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis.
J. Clin. Invest. 56: 1155 - 1163 (1975)
70. Häyry P., von Willebrand E.
Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts
Ann. Clin. Res. 13: 288 - 306 (1981)
71. Hafeman D. G., Lucas Z. J.
Polymorphonuclear leukocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst.
J. Immunol. 123: 55 - 62 (1979)
72. Hankansson L., Venge P.
Kinetic studies of neutrophil phagocytosis. V Studies on the cooperation between the Fc and C3 b-receptors.
Immunology 47: 687 - 694 (1982)
73. Hellström K. E., Hellström I.
Cellular immunity against tumor antigens.
Advanc. Cancer Res. 12: 167 - 223 (1969)
74. Hellström I., Hellström K. E., Sjögren H. O.
Serum mediated inhibition of cellular immunity to methylcholanthrene induced murine sarcoma.
Cell. Immunol. 1: 18 - 30 (1970)

75. Heppner G. H.
Blocking antibodies and enhancement.
Ser. Haemat. 5: 41 - 66 (1972)
76. Hibberd A. D., Metcalf D.
Proliferation of macrophage and granulocyte precursors
in response to primary and transplanted tumors.
Isr. J. Med. Sci. 7: 202 - 210 (1952)
77. Hoepke H.
Die antiblastische Wirkung der Milz von Walker-Tumor-
Ratten.
Zschr. Krebsforsch. 58: 378 - 424 (1952)
78. Hollander N., Isakov N., Segal S., Feldman M.
An immunoregulatory factor associated with spleen cells
from tumor-bearing animals. II. Characterization of the
cell populations involved in its production and release.
Int. J. Cancer 22: 471 - 478 (1978)
79. Hopkins J., McConnell I.
Immunological aspects of lymphocytes recirculation.
Vet. Immunol. Immunopathol. 6: 3 - 33 (1984)
80. Hough A. J., Hubbard W. C., Dates J. A.
VX₂ Carcinoma, pulmonary metastases and neutrophilic
leukocytosis.
Am. J. Pathol. 112: 231 - 237 (1983)
81. Ilfeld D., Carnaud C., Cohen I. R., Trainin N.
In vitro cytotoxicity and in vivo tumor enhancement
induced by mouse spleen cells autosenitized in vitro.
Int. J. Cancer 12: 213 - 222 (1973)
82. Isakov N., Segal S., Hollander N., Feldman M.
An immunoregulatory factor associated with spleen cells
from tumor-bearing animals. I. Effect on tumor growth
and antibody production
Int. J. Cancer 22: 465 - 470 (1978)
83. Kaliss N., Molmut N.
Effect of prior injections of tissue antisera on the
survival of cancer homoiografts in mice.
Cancer Res. 12: 110 - 112 (1952)
84. Kammer G. M., Smith J. A. Mitchell R.
Capping of human T cell specific determinants: kinetics
of capping and receptor re-expression and regulation by
the cytoskeleton.
J. Immunol. 130: 38 - 44 (1983)

85. Kaliss N.
Dynamics of immunologic enhancement.
Transpl. Proc. 2: 59 - 67 (1970)
86. King M. M., Lai E. K., McCay P. B.
Singlet oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid-peroxidation.
J. Biol. Chem. 250: 6496 - 6502 (1975)
87. Kirchner H., Chused T. M., Herberman R. B., Holden H. T., Larvon D. H.
Evidence of suppressor cell activity in spleens of mice bearing primary tumors induced by Moloney sarcoma virus.
J. Exp. Med. 139: 1473 - 1487 (1974)
88. Kitagawa S., Ohta M., Nojiri H., Kakinuma K., Saito M., Takaku F., Miura Y.
Functional maturation of membrane potential changes and superoxide-producing capacity during differentiation of human granulocytes.
J. Clin. Invest. 73: 1062 - 1071 (1984)
89. Klostergaard J., Danlap B., Lisafeld B. A., Klein E., Holtermann O. A.
Enhancement of granulocyte phagocytosis by products of PPD stimulated human lymphocytes.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm. 16: 171 - 174 (1977)
90. Klostergaard J., Lisafeld B. A., Danlap B., Klein E., Holtermann O. A.
Activation of neutrophilic granulocytes by products of human lymphocytes.
Intl. Arch. Allergy Appl. Immunol. 57: 542 - 548 (1978)
91. Kodoma T., Sendo F., Kobayashi H.
Leukemoid reaction in Balb/c mice bearing transplanted tumors.
Cancer Res. 34: 176 - 180 (1974)
92. Konda S., Nakao Y., Smith R. T.
The stimulatory effect of tumor bearing upon the T- and B-cell supopulations of the mouse spleen.
Cancer Res. 33: 2247 - 2256 (1973)
93. Konda S., Smith R. T.
The effects of tumor-bearing upon changes in cell distribution and membrane antigen characteristics in murine spleen and thymus cell subpopulations.
Cancer Res. 33: 1878 - 1884 (1973)

94. Kunewick J. P., Phillips E. L., Erhard P.
Increase in number of splenic transplantable colony-forming units in the SJL/S mice after infection with Rauscher leukemia virus.
JNCI 49: 1101 - 1106 (1972)
95. Kunzo O., Konage E., Okada T., Kunisada K., Yumura M., Tanaka S.
Effect of splenectomy in tumor-bearing mice and gastric cancer patients.
Gann 68: 731 - 736 (1977)
96. Kurata T., Micksche M.
Correlation of immune response with clinical stage in Lewis Lung tumor-bearing mice.
Oncology 35: 155 - 159 (1978)
97. Laing C. A.
Kinetics of the reactivity of subpopulations of spleen cells of mice bearing virus-induced mammary tumors to syngeneic antigenic extracts in vitro.
Cancer Immunol. Immunother. 13: 98 - 104 (1982)
98. Laird A. K.
Dynamics of tumor growth.
Br. J. Cancer 18: 490 - 502 (1964)
99. Lala P. K., McKenzie F. C.
An analysis of T lymphocyte subsets in tumour-transplanted mice on the basis of Lyt antigenic markers and functions.
Immunology 47: 663 - 677 (1982)
100. Lala P. K., Terrin M., Lind C., Kaizer L.
Hemopoietic redistribution in tumor-bearing mice.
Exp. Hematol. 6: 283 - 298 (1978)
101. Lambert P. H., Dixon F. J., Zubler R. H., Agnello V., Cambiaso C., Casale P., Olarke J., Cowdery J. S., McDuffie F. C., Hay F. C., Mac Lennan I. C. M., Masson P., Müller-Eberhard H. J., Penttinen K., Smith M., Tappeiner G., Theofilopoulos A. N., Verrost P.
A collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum.
J. Clin. Lab. Immunol. 1: 1 - 16 (1978)
102. Lappat E. J., Cawein M.
A study of the leukemoid response to transplantable A-280 tumor in mice.
Cancer Res. 24: 302 - 311 (1964)

103. Lee M. Y., Rosse C.
Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis inducing mammary carcinoma.
Cancer Res. 42: 1255 - 1260 (1982)
104. Lee M. Y., Sperlin A., Dale D. C.
Distribution of granulocytopoietic committed stem cells in mice with tumor induced neutrophilia.
Exp. Hemat. 8: 249 - 255 (1980)
105. Lersch C., Schunke M., Hammer C., Brendel W.
Influence of splenectomy on tumor growth in T-cell-deficient mice.
Chirurg. Forum 86: 121 - 123 Springer, Berlin, Heidelberg (1986)
106. Llende M., Santiago-Delpin E. A., Lavergne J.
Immunobiological consequences of splenectomy: a review
J. Surg. Res. 40: 85 - 94 (1986)
107. Lopez A. F., Nicola N. A., Burgess A.W., Metcalf D., Battye P. L., Sewell W. A., Vadas M.
Activation of granulocyte cytotoxic function by purified mouse colony-stimulating factors.
J. Immunol. 131: 2983 - 2988 (1983)
108. Manor Y., Treves A. J., Cohen I. R.
Transition from T cell protection to T cell enhancement during tumor growth in an allogeneic host.
Transplantation 22: 360 - 366 (1976)
109. Matheisz J. S., Allen J. C.
Fatigue of human polymorphonuclear leukocyte function associates with bacterial ingestion.
Clin. Immunol. Immunopathol. 12: 125 - 131 (1979)
110. Mayo J. G.
Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis Lung Tumor.
Cancer Chemother. Rep. Part II. 3: 325 - 330 (1972)
111. McNeal T. A.
Antigenic stimulation of bone marrow colony-forming cells.
Immunology 18: 61 - 72 (1970)
112. Metcalf D., Moore M. A. S.
Haemopoietic Cells pp. 107 - 108
North Holland Publ. Co. Amsterdam (1971)

113. Meyer J. D., Argyris B. F., Ph. D., Meyer J. A., M. D.
Splenectomy, suppressor cell activity and survival in
tumor bearing rats.
J. Surg. Res. 29: 527 - 532 (1980)
114. Milas L., Basic I.
Stimulated granulocytopoiesis in mice bearing fibrosar-
coma.
Eur. J. Cancer 8: 309 - 313 (1972)
115. Milas L., Faykus M. H., McBride W. H., Hunter N., Peters
L. J.
Concomitant development of granulocytosis and enhan-
cement of metastases formation in tumor-bearing mice.
Clin. Expl. Metastasis 2: 181 - 190 (1984)
116. Milas L., Mujagic H.
The effect of splenectomy on fibrosarcoma metastases in
lungs of mice.
Int. J. Cancer 11: 186 - 190 (1973)
117. Möller E.
Interaction between tumor and host during progressive
neoplastic growth in histoincompatible recipients.
JNCI 35: 1053 - 1059 (1965)
118. Moeschlin S.
Die Morphologie des Milzpunktates.
Schweiz. med. Wschr. 1: 243 - 244 (1947)
119. Monette F. C., Morse B. S., Howard D., Niskanen E.,
Stohlman F.
Hemopoietic stem cell poliferation and migration after
Bordetella pertussis vaccine.
Cell. Tiss. Kinet. 5: 121 - 129 (1972)
120. Motomura S., Dexter T. M.
The effect of prostaglandin E₁ on hemopoiesis in long-
term bone marrow cultures.
Exp. Hemat. 8: 298 - 303 (1980)
121. Nathan C. F., Brukner L. H., Silverstein S. C.,
Cohn Z. A.
Extracellular cytolysis by activated macrophages and
granulocytes.
J. Exp. Med. 149: 84 - 99 (1979)

122. Nordlund J., Gershon R. K.
Splenic regulation of the clinical appearance of small tumors.
J. Immunol. 114: 1486 - 1490 (1975)
123. Nouza K., Nemec M., Dräber P.
The influence of host splenectomy on the tumour allograft-promoting effectiveness of antilymphocyte serum.
Folia Biol. 19: 267 - 272 (1973)
124. Osmond D. G., Nossal G. J. V.
Differentiation of lymphocytes in mouse bone marrow. I. Quantitative radioautographic studies of antiglobulin binding by lymphocytes in bonemarrow and lymphoid tissues.
Cell. Immunology 13: 117 - 131 (1974)
125. Otu A. A., Russell R. J., Wilkinson P. C.
Alterations of mononuclear phagocyte function induced by Lewis Lung carcinoma in C 57 Bl mice.
Br. J. Cancer 36: 330 - 340 (1977)
126. Old L. J., Clarke D. A., Benacerraf B., Stockert E.
Effect of prior splenectomy on the growth of sarcoma 180 in normal and *Bacillus Calmette Guerin* infected mice.
Experientia 18: 335 - 336 (1962)
127. Papst R.
Die Milz - ein überflüssiges Organ?
Med. Klin. 76: 210 - 216 (1981)
128. Philips J., Goodman B., Kelly V.
Percutaneous thoracic aspiration needle biopsies.
Pathology 14: 211 - 213 (1982)
129. Pierce C. W., Kapp J. A.
Regulation of immune response by suppressor T cells.
Contemp. Top. Immunobiol. 5: 91 - 143 (1976)
130. Pollack S. B.
Effect of host sex and splenectomy on Moloney virus induced sarcomas.
Int. J. Cancer 8: 264 - 271 (1971)

131. Prehn R. T.
The immunity and inhibiting role of the spleen and the effect of dosage and route of antigen administration in a homograft reaction:
In: Albert F., Lejeune - Ledant G. (eds)
Biological Problems of Grafting. Les Congres et Col-
legues de L'Universite de Liege 12: 163 - 175 (1959)
132. Raff M. C.
Theta isoantigen as a marker of thymus-derived lympho-
cytes in mice.
Nature 224: 378 - 379 (1969)
133. Raff M. C.
Two distinct populations of peripheral lymphocytes in
mice distinguishable by immunofluorescence.
Immunology 19: 637 - 650 (1970)
134. Raff M. C.
Surface antigenic markers for distinguishing T and B
lymphocytes in mice.
Transplant. Rev. 6: 52 - 80 (1971)
135. Raff M. C., Cantor H.
Subpopulations of thymus cells and thymus derived lym-
phocytes.
Prog. Immunol. 1: 83 - 93 (1971)
136. Raff M. C., Wortis H. H.
Thymus dependence of Θ bearing cells in the peripheral
lymphoid tissues of mice.
Immunology 18: 931 - 942 (1970)
137. Reincke U., Burlington H., Carsten A. L., Cronkite E.
P., Laissue J. A.
Hemopoietic effects in mice of a transplanted granulocy-
tosis - inducing tumor.
Exp. Hematol. 6: 421 - 430 (1978)
138. Risdall R. H., Aust J. C., McKhann C. F.
Immune capacity and response to antigenic tumors.
Cancer Res. 33: 2078 - 2085 (1973)
139. Robinson W. A.
Granulocytosis in neoplasia.
Annal New York Acad. Sci. 230: 212 - 218 (1974)
140. Robinson W. A., Mangalik A.
The regulation of granulopoiesis: positive feed-back.
Lancet 2: 742 - 743 (1972)

141. Ron Y., Gorelik E., Feldman M., Segal S.
Effect of splenectomy on the progression of postoperative pulmonary metastases of the 3 LL tumor.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18: 391 - 397 (1982)
142. Roos D., Bot A. A. M., Schaik M. L. J., De Boer M., Daha M. R.
Interaction between human neutrophils and zymosan particles: the role of opsonins and divalent cations.
J. Immunol. 126: 433 - 440 (1981)
143. Rosen H., Klebanoff S. J.
Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase deficient leukocytes
J. Clin. Invest. 58: 50 - 60 (1976)
144. Rotter V., Trainin N.
Inhibition of tumor growth in syngeneic chimeric mice mediated by a depletion of suppressor T cells.
Transplantation 20: 68 - 74 (1975)
145. Rowland G. F., Edwards A. J., Hurd C. M., Sumner M. R.
Changes in lymphoreticular tissues during growth of a murine adenocarcinoma. III. Plaque-forming cell response in lymph nodes and spleen.
JNCI 47: 321 - 327 (1971)
146. Rowley D. A.
The effect of splenectomy on the formation of circulation antibodies in the adult male albino rat.
J. Immunol. 64: 289 - 295 (1950)
147. Rumi L., Pasqualini C. D., Rabasa S. L.
Growth of sarcoma 180 in splenectomized mice bearing diffusion chambers containing spleen or tumor cells.
Europ. J. Cancer 7: 551 - 555 (1971)
148. Sachs L.
Angewandte Statistik
Springer Verlag (1983)
149. Sakai N., Shikita M., Tsuneoka K., Bessho M., Hirashima K.
Macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor separated from fibrosarcoma tissue in mice.
Gann 75: 355 - 361 (1984)

150. Santer V., Mastromarino J., Lala P. K.
Characterization of lymphocytes subsets in spontaneous mammary tumors and lymphoid organs.
Int. J. Cancer 25: 159 - 168 (1980)
151. Sato N., Asano S., Ueyama Y., Mori M., Okabe T., Kondo Y., Ohsawa N., Kosaka K.
Granulocytosis and colony stimulating activity (CSA) produced by a human squamous cell carcinoma.
Cancer 43: 605 - 610 (1979)
152. Schalm O. W., Jain O. W., Carroll E. J.
Veterinary Hematology
Philadelphia, Lea & Febiger (1975)
153. Schechter B., Segal S., Feldman M.
Enhancing lymphocytes in spleens of tumor-bearing mice: affinity chromatography on insolubilized histamine.
Int. J. Cancer 20: 239 - 246 (1977)
154. Seidel H. J.
Hemopoietic stem cells in mice with virus - induced leukemia. II. Studie in C3H mice after Rauscher virus infection.
Z. Krebsforsch. 80: 229 - 237 (1973)
155. Sendo F., Kodama T., Kobayashi H.
Leukemoid reaction in Balb/c mice bearing transplantable tumor.
Gann 64: 297 - 300
156. Shalaby M. R., Assisi F. C., Aggarwal B., Svedersky L. P., Palladino M. A.
Activation of human polymorphonuclear neutrophils by lymphokines.
Fed. Proc 43: 1924 Nr. 2964 (1984)
157. Shiku H.
Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro: evidence for functional heterogeneity related to surface phenotype of T cells.
J. Exp. Med. 141: 227 - 239 (1975)
158. Shimizu M., Kimura T., Kakinuma M., Ohara T.
Intrathymic injection of antigen: a potent procedure for the induction of suppressor T cells.
J. Immunol. Methods 31: 41 - 50 (1979)

159. Sheridan J. W., Metcalf D.
A low molecular weight factor in lung conditioned medium stimulating granulocyte and mononuclear colony formation in vitro.
J. Cell. Physiol. 81: 11 - 24 (1973)
160. Simpson-Herren L., Lloyd H. H.
Kinetic parameters and growth curves for experimental tumour systems.
Cancer Chemother. Rep. Part I. 54: 143 - 174 (1970)
161. Slavin S., Zan - Bar I., Strober S.
Long-term effects of splenectomy on immunocompetent cells of adult mice.
Cell. Immunol. 55: 444 - 455 (1980)
162. Small M.
Characteristics of the immature cells involved in T cell mediated enhancement of syngeneic tumour growth.
J. Immunol. 118: 1517 - 1523 (1977)
163. Small M., Trainin N.
Separation of populations of sensitized lymphoid cells into fractions inhibiting and fractions enhancing syngeneic tumor growth in vivo.
J. Immunol. 117: 292 - 297 (1976)
164. Smith R. J., Iden S. S., Bowmann B. J.
Activation of the human neutrophil respiratory burst with zymosan-activated serum.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 121: 695 - 701 (1984)
165. Smith R. T., Konda S.
The stimulatory effects of bearing primary methylcholanthrene - induced tumors upon the murine lymphoreticular system.
Int. J. Cancer 12: 577 - 588 (1973)
166. Smith R. L., Weidemann M. J.
Reactive oxygen production associated with arachidonic acid metabolism by peritoneal macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 97: 973 - 980 (1980)
167. Sprent J., Miller J. F. A. P.
Effect of recent antigen priming on adoptive immune responses. II. Specific unresponsiveness of circulation lymphocytes from mice primed with heterologous erythrocytes.
J Exp. Med. 139: 1 - 12 (1974)

168. Starkebaum G., Jimenez R. A. H., Arend W. P.
Effect of immune complexes on human neutrophil phagocytic function.
J. Immunol. 128: 141 - 147 (1982)
169. Starkebaum G., Stevens D. L., Henry C., Gavin S. E.
Stimulation of human neutrophil chemiluminescence by soluble immune complexes and antibodies to neutrophils.
J. Lab. Clin. Med. 98: 280 - 291 (1981)
170. Steel G. G.
Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours.
Europ. J. Cancer 3: 381 - 387 (1967)
171. Stell G. G.
Cell loss from experimental tumours.
Cell Tissue Kinet 1: 193 - 207 (1968)
172. Stylos W. A., Chirigos M. A., Lyng P. J., Lengel C. R.
T and B lymphocyte populations of the spleen and thymus in normal and immunosuppressed Balb/c mice.
Cell. Immunology 40: 79 - 90 (1978)
173. Sugiura K., Stock C.
Studies in tumor spectrum
Cancer 5: 382 - 402 (1952)
174. Tannock I.
The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour.
Br. J. Cancer 22: 258 - 273 (1968)
175. Taubman S. B., Cogen R. B.
Cell detaching activity mediated by an enzyme(s) obtained from human leukocyte granules.
Lab. Invest. 32: 555 - 560 (1975)
176. Treves A. J., Cohen I. R.
Recruitment of effector T lymphocytes against a tumor allograft by T lymphocytes sensitized in vitro.
JNCI 51: 1919 - 1925 (1973)
177. Treves A. J., Cohen J. R., Felman M.
Suppressor factor secreted by T-lymphocytes from tumor-bearing mice.
JNCI 57: 409 - 414 (1976)

178. Treves A. J., Cohen I. R., Feldman M.
A syngeneic metastatic tumor model in mice: the natural immune response of the host and its manipulation.
Israel. J. Med. Sci. 12: 369 - 383 (1976)
179. Treves A. J., Carnaud C., Trainin N., Feldman M., Cohen J. R.
Enhancing T-lymphocytes from tumor-bearing mice suppress host resistance to a syngeneic tumor.
Europ. J. Immunol. 4: 722 - 727 (1974)
180. Umiel T., Trainin N.
Immunological enhancement of tumor growth by syngeneic thymus-derived lymphocytes.
Transplantation 18: 244 - 250 (1974)
181. Undritz E.
Sandoz atlas of haematology
Sandoz LTD Basel (1978)
182. Vadas M. A., Clark-Lewis I.
Regulation of human granulocyte function by products derived from murine tumor.
Expl. Hematol. 13: 151 - 156 (1985)
183. Vadas M. A., Nicola N.A., Metcalf D.
Activation of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity of human neutrophils and eosinophils by separate colony - stimulating factors.
J. Immunol. 130: 795 - 799 (1983)
184. Voisin G. A.
Immunological facilitation, a broadening of the concept of the enhancement phenomenon.
Progr. Allergy 15: 328 - 485 (1971)
185. Ward P. A., Hill H. J.
C 5 chemotactic fragments produced by an enzyme in lysosomal granules of neutrophils.
J. Immunol. 104: 535 - 543 (1970)
186. Webb L. S., Keele B. B., Jonston R. B.
Inhibition of phagocytosis-associates chemiluminescence by superoxide dismutase.
Infect. Immun. 9: 1051 - 1056 (1974)

187. Weidemann M. J., Peskar B. A., Wrogemann K., Rietschel E. Th., Staudinger H., Fischer H.
Prostaglandin and thromboxan synthesis in a pure macrophage population and the inhibition by E - type prostaglandins of chemiluminescence.
FEBS Letters 89: 136 - 140 (1978)
188. Weinberg S. R., Gruber D. F., Exum E. D., Ledney . D.
Modulations in mouse hemopoiesis after engraftment with Lewis Lung (3 LL) Carcinoma Cells.
Expl. Cell. Biol. 53: 252 - 259 (1985)
189. Weiss M. L., Hess F.
Splenic transposition with ligation of the vascular pedicle in rodents.
Eur. Surg. Res. 10: 283 - 289 (1978)
190. Whitney R. B., Barbara L., Pope L., Levy G.
Immune competence and immunosuppressive factors in splenectomized tumor-bearing mice.
Cell. Immunol. 28: 15 - 21 (1977)
191. Wick G.
Immunfluoreszenz - Versuche zur Standardisierung
Wiener klin. Wochenschr. Jg. 84, Heft 1: 2 - 7 (1972)
192. Willems J., Jonian M.
Determination of immune complexes by chemiluminescence of stimulated murine phagocytes: comparison with other quantification methods.
in: Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence edited by: Kricka, Stanlex, Thorpe, Whitehead
Academic press 1984
193. Wolf N. S., Trentin J. J.
Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells.
J. Exptl. Med. 127: 205 - 214 (1967)
194. Woodruff M. F., Symes M. O.
The significance of splenomegaly in tumor-bearing mice.
Br. J. Cancer 16: 120 - 130 (1984)
195. Yamagishi H., Oka T., Hashimoto I., Pellis N. R., Kahan B. D.
The role of spleen in tumor bearing host: I., II.
Jpn. J. Surgery 14: 61 - 77 (1984)

196. Young M. R., Henderson S.
Enhancement in immunity of tumor bearing mice by immunization against prostaglandin E₂.
Immunol. Commun. 11: 345 - 356 (1982)
197. Young R. M., Knies S.
Prostaglandin E production by Lewis Lung carcinoma: mechanism for tumor establishment in vivo.
JNCI 72: 919 - 922 (1984)
198. Young R. M., Sundharadas G., Cantarow W. D., Kumar P. R.
Purification and functional characterization of a low molecular weight immune modulating factor produced by Lewis Lung carcinoma.
Int. J. Cancer 30: 517 - 524 (1982)

Besonderen Dank sagen möchte ich:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Brendel, der mich in seinem von Gemeinschaftsgeist und persönlicher Atmosphäre geprägten Institut, als Doktorand aufgenommen hat.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer, der mir bei Fragen stets mit Rat und Tat entgegenkam.

Herrn Dr. med. C. Lersch für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen. Seine Anregungen und Ratschläge haben den Verlauf meiner Arbeit entscheidend beeinflußt.

Herrn Dr. med. vet. F. Krombach für die mir gewährte Kritik und Hilfe.

Frau G. Höbel für die perfekte Produktion der Abbildungen.

Frau P. Lenz für ihre treue und gewissenhafte Hilfe im Labor.

Herrn O. Frisch, stellvertretend für alle Tierpfleger.

Lebenslauf

27. März 1959 geboren in Augsburg als Sohn des Diplomingenieurs (FH) Klaus Thiel und seiner Ehefrau, geb. Martin
- 1966 - 1970 Besuch der Wittelsbacher Volksschule in Augsburg
- 1970 - 1979 Besuch des naturwissenschaftlichen Holbein Gymnasium in Augsburg
- 1979 Abitur
- Herbst 1979 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Sommer 1981 Ärztliche Vorprüfung
- Sommer 1982 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Herbst 1982 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Chirurgische Forschung
- Sommer 1984 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Herbst 1984 Eheschließung mit Michaela Schönsiegel, cand. med.
- 1984 - 1985 Praktisches Jahr
Anästhesie - Klinikum Großhadern
Innere Medizin - Medizinische Klinik Innenstadt
Chirurgie - Klinikum Großhadern
- Herbst 1985 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
13. Nov. 1985 Approbation als Arzt
- seit
Frühjahr 1986 Assistenzarzt des Anästhesiologischen Instituts (Prof. Dr. K. Peter), Klinikum Großhadern

